

**ÉTUDE CYTOLOGIQUE
ET CYTOCHIMIQUE DE CULTURES
DE TISSU DE REIN DE SOURIS
SNELL NAINES ET NORMALES,
ET RÉPONSE
À L'INFECTION PAR LE VIRUS PR8**

Thèse de doctorat
par
Michel HORISBERGER

Institut suisse de recherches expérimentales sur le cancer
Lausanne

Thèse présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel
pour obtenir le grade de docteur ès sciences

1967

ÉTUDE CYTOLOGIQUE ET CYTOCHIMIQUE
DE CULTURES DE TISSU DE REIN
DE SOURIS SNELL NAINES ET NORMALES,
ET RÉPONSE À L'INFECTION PAR LE VIRUS PR8



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555027_0036

**ÉTUDE CYTOLOGIQUE
ET CYTOCHIMIQUE DE CULTURES
DE TISSU DE REIN DE SOURIS
SNELL NAINES ET NORMALES,
ET RÉPONSE
À L'INFECTION PAR LE VIRUS PR8**

Thèse de doctorat

par

Michel HORISBERGER

Institut suisse de recherches expérimentales sur le cancer
Lausanne

Thèse présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel
pour obtenir le grade de docteur ès sciences

1967

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport de Messieurs les professeurs Cécile
Leuchtenberger et Henri Isliker (Lausanne), Claude
Favarger et Jean-Pierre Bargetzi (Neuchâtel), autorise
l'impression de la présente thèse sans exprimer d'opinion
sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 26 janvier 1967.

Le doyen de la Faculté des sciences :

Werner SORENSEN.



A ma mère

REMERCIEMENTS

Il nous est agréable de manifester ici notre gratitude aux diverses personnes qui nous ont aidé dans l'accomplissement de notre recherche :

à Madame le Professeur Cecilie Leuchtenberger qui nous a proposé le sujet de cette thèse et dont l'autorité et la parfaite maîtrise scientifique nous ont soutenu et stimulé au cours de notre recherche. Nous lui en exprimons notre fervente reconnaissance ;

à Monsieur le Professeur R. Leuchtenberger pour avoir constamment enrichi nos connaissances scientifiques, spécialement dans le domaine de la pathologie expérimentale ;

à Monsieur le Professeur R. Matthey qui nous a fait l'honneur de nous initier personnellement à ses techniques cytologiques ;

à Monsieur le Professeur H. Isliker, directeur de l'Institut suisse de recherches expérimentales sur le cancer pour toutes les facilités qu'il nous a accordées lors de notre travail dans son institut.

INTRODUCTION

En 1929, Snell découvre et sélectionne une lignée de souris caractérisées par une déficience hypophysaire récessive de type mendélien. A l'état homozygote ce gène donne des souris naines gardant une taille juvénile. Le site primaire de l'action de ce gène réside dans la partie antérieure de l'hypophyse (Carsner et Rennels 1960). Cette lignée présente un grand intérêt parce qu'elle permet d'étudier la relation existant entre la polyploïdie et l'hormone somatotrope. En effet les souris naines ne présentent pas les classes de noyaux caractérisées par des volumes nucléaires dans le rapport 1:2:4 et normalement présentes dans le foie des souris normales et d'autres mammifères (Jacobj 1925 : Helweg-Larsen 1952). En 1954, Leuchtenberger et coll. prouvent à l'aide de la microspectrophotométrie que ces classes de dimensions nucléaires correspondent à des classes polyploïdes liées à la présence d'hormone somatotrope. L'injection de cette hormone aux souris naines provoque la formation de noyaux polyploïdes, mais ne rétablit pas la taille normale ; cette expérience indique que d'autres facteurs supplémentaires contrôlent la croissance des organes. Inversement, l'hypophysectomie des jeunes rats conduit à l'arrêt de la formation des noyaux tétraploïdes du foie (Di Stefano et Diermeier 1956).

La polyploïdie dépend encore de l'âge de l'organe : le foie des enfants ne contient que la classe diploïde ; chez les adultes des classes tétraploïdes et octoploïdes sont observées (Leuchtenberger et coll. 1954 b). La polyploïdie en fonction de l'âge et de la croissance a été étudiée plus spécialement par Swartz (1956) chez l'homme. Ses résultats montrent que jusqu'à l'âge de 6 ans, le foie n'a que des noyaux diploïdes. Entre 6 et 10 ans certains noyaux synthétisent de l'ADN. Les noyaux tétraploïdes apparaissent à 11-14 ans, les noyaux octoploïdes à environ 20 ans. Les trois classes d'ADN se maintiennent jusqu'à la mort. Les conclusions de Swartz mettent en évidence deux faits principaux : premièrement, le développement de la polyploïdie est en rapport avec l'hormone somatotrope. Deuxièmement, la formation de cellules polyploïdes contribue à la croissance du foie. Ce dernier point a été étudié plus en détail par Naora (1957) dans le foie du rat. Il compare les populations diploïdes et tétraploïdes des noyaux du foie en fonction du poids de cet organe. Pendant la phase de croissance, le nombre de noyaux tétraploïdes augmente aux dépens de la population diploïde

qui diminue. L'hypothèse correspondant le mieux aux faits expérimentaux veut que les noyaux tétraploïdes se forment pendant l'interphase d'un noyau diploïde, sans entraîner la mitose. Un autre modèle fait intervenir les cellules binucléées dans la formation des noyaux cellulaires polyploïdes (Nadal et Zajdela 1966) : le matériel nucléaire fusionnerait à un moment déterminé de leur division mitotique.

De toutes les études précitées, il est évident que l'hormone somatotrope influence la formation des noyaux polyploïdes, du moins dans les organes où ils apparaissent normalement. D'autres observations suggèrent l'action importante de cette hormone sur certains aspects de la duplication de l'ADN : les tumeurs malignes apparaissent tardivement ou croissent lentement dans des animaux hyphysectomisés. L'hypophysectomie inhibe le développement de tumeurs provoquées par des substances carcinogènes (Griffin et coll. 1953). Avec des doses d'uréthane qui induisent de nombreuses tumeurs chez la souris normale, seules quelques rares tumeurs apparaissent chez la souris naine, et elles restent confinées à quelques groupes de cellules (Heston 1966).

Le problème qui se pose dès lors concerne les modifications opérées par cette hormone au niveau de la cellule, ou même du noyau. Sont-elles durables ou irréversibles, ce qui correspondrait à une réelle différenciation ? L'étude de ce problème *in vivo* est assez compliquée parce que l'organisme vivant est un système fermé, en constant équilibre biologique. L'expérimentation est soumise à des contingences difficilement contrôlables : de nombreux facteurs interviennent simultanément, constance du milieu intérieur, interactions entre différents organes, action conjuguée de plusieurs hormones, etc. Par contre, les conditions *in vitro* offrent un système ouvert où l'environnement des cellules, le milieu de culture, la température, etc. peuvent être contrôlés et standardisés. La comparaison *in vitro* de tissu ayant eu un développement normal (souris normale) avec des tissus atrophiques conditionnés par une déficience hypophysaire (souris naine) a paru un bon système pour tester les changements induits par l'hormone somatotrope au niveau de la cellule. Ce système permet également de libérer des potentialités cachées des cellules sous des conditions variables, normales et anormales. Comme condition anormale, une infection virale présente un intérêt très grand à cause de deux caractéristiques essentielles des virus. D'une part, leur matériel génétique est composé soit d'ARN, soit d'ADN ; l'interférence des métabolismes des acides nucléiques viraux et cellulaires est un problème de première importance. D'autre part, le virus ne peut se reproduire qu'à l'intérieur d'une cellule hôte. La proximité de ces deux génomes fournit un système très intéressant pour étudier leur interaction. En particulier cela permet d'aborder un problème biologique fondamental, à savoir la modification éventuelle de l'expression biologique du matériel génétique de la cellule hôte sous l'influence du virus. Un virus ARN appartenant à la souche PR8 de l'influenza type A (groupe des Myxovirus) a été choisi parce que son

rôle dans la carcinogénèse expérimentale a été étudié par Leuchtenberger et coll. (1965, 1966).

La culture des deux types de cellules dans des conditions normales et leur réponse à l'infection fournit deux systèmes de comparaison, permettant en outre de connaître un nouvel aspect de la relation virus-cellule hôte. Une troisième méthode de comparaison consiste à établir des subcultures continues ; ce critère est susceptible de donner des indications concernant les différences plus physiologiques que morphologiques.

Le choix du tissu à étudier *in vitro* est soumis à plusieurs considérations puisqu'on ne peut parler de différenciation *in vitro* que si les cellules prolifèrent par activité mitotique. Les cellules parenchymateuses du foie où s'observe principalement la polyploïdie ne peuvent pas être cultivées *in vitro* : les cellules qui en dérivent appartiennent plutôt à l'épithélium des conduits biliaires, à l'endothélium vasculaire, etc. (Perske et coll. 1957 ; Sato et coll. 1960). Le choix s'est porté sur le rein qui fournit presque exclusivement des cellules épithéliales provenant des tubules. Cet organe ne contient pas de cellules polyploïdes, mais est atrophique chez les souris naines. Les cultures rénales présentent encore un avantage : elles sont susceptibles d'être infectées par le virus PR8.

La microspectrophotométrie introduite par Pollister et Ris (1947) a rendu possible l'estimation de l'ADN du noyau *in situ*. La valeur de cette méthode après coloration au Feulgen n'est plus guère contestable (revue Leuchtenberger 1958) ; elle permet le dosage de l'ADN nucléaire pendant l'interphase et s'applique particulièrement bien à l'étude de la polyploïdie. La microspectrophotométrie ne distingue pas entre polyploïdie (nombre chromosomique multiple entier du nombre de base) et polyténie (augmentation du nombre de fibres d'ADN dans les chromosomes dont le nombre reste inchangé). Cependant elle possède l'avantage unique de permettre une corrélation directe entre la morphologie et le contenu en ADN de la même cellule. Elle a permis à Leuchtenberger et coll. (1954 a) de prouver que les classes nucléaires présentes dans le foie et le pancréas des souris normales et absentes dans les souris naines (Helweg-Larsen 1952) correspondent exactement à des classes d'ADN. Cette méthode s'applique également à l'étude de processus pathologiques, telles les cellules cancéreuses où la teneur en ADN est beaucoup plus variable que dans le tissu normal (Leuchtenberger et coll. 1954 b). C'est encore une méthode importante pour l'étude cytologique et cytochimique simultanée des relations virus-cellule hôte lors d'infection (Leuchtenberger et coll. 1959).

MÉTHODES

Abréviations : ADN, acide désoxyribonucléique ; ARN, acide ribonucléique ; Dw, souris naine (de l'anglais dwarf) ; Norm, souris normale. Les initiales THO suivies d'un numéro d'ordre désignent les expériences concernant les cultures de tissu.

A. Elevage

Les souris de la souche Snell (Snell 1929) proviennent d'un élevage personnel. Elles sont croisées entre frères et sœurs de la même portée. A l'origine cette souche a été fournie par le D^r Schultz-Larsen, Institut de génétique humaine, Copenhague. Les souris sont nourries avec du granulé ; l'eau est renouvelée chaque jour. Les cages sont lavées et stérilisées deux fois par semaine.

B. Culture de tissu

Les reins de souriceaux de 12-21 jours, exceptionnellement de 38 jours dans une expérience, sont prélevés aseptiquement dans une solution tampon stérile. Des pièces de rein et de foie sont fixées au Lavdowsky (2 ml acide acétique glacial, 50 ml alcool 95 %, 10 ml formol conc., 40 ml eau dist.) pour un examen histologique.

Les reins sont débarrassés de leur capsule et de la région du bassinet pour finalement ne conserver que le tissu du cortex formé en majorité de cellules épithéliales. La suspension de cellules est obtenue par traitement des tissus dans une solution de trypsine (« Difco certified » 0,25 % dans du tampon phosphate sans Ca) avec agitation magnétique continue. A intervalles réguliers le surnageant est prélevé, les cellules séparées par centrifugation et resuspendues dans du milieu de culture. Le milieu de culture est celui de Eagle (1959) spécialement modifié (Smith et coll. 1960 ; enrichi quatre fois en acides aminés et en vitamines) pour les expériences avec virus, et additionné de 10 % de sérum de veau (Microbiological Associates Inc.). Ce milieu était préparé à l'institut, mais sa composition parfois irrégulière a occasionné la perte de plusieurs expériences.

La dilution d'ensemencement est de $25\text{-}30\cdot 10^3$ groupes de cellules par ml. Les cellules sont cultivées sur des lamelles couvre-objet de verre placées dans des boîtes de pétri de plastique. Les boîtes sont disposées dans une étuve à CO_2 à 37°C . Le milieu de culture est régulièrement renouvelé deux fois par semaine.

C. Virus

Le fluide allantoïque d'œufs infectés par une haute dilution (10^{-6}) de virus PR8 forme la solution stock de virus (titre hémagglutinant 1/512 avec des érythrocytes humains du groupe 0). Il est conservé en ampoule scellée à -70°C . Les cultures de 4 à 6 jours sont infectées avec du virus PR8 mille fois dilué dans du milieu de culture. Cette dose infecte pratiquement plus du 95 % des cellules. Le milieu de culture n'est pas renouvelé pendant les trois à quatre premiers jours qui suivent l'infection.

D. Hémadsorption et titre hémagglutinant

Ces techniques sont basées sur une propriété fondamentale des Myxovirus, à savoir l'interaction entre les virus et les hématies se manifestant sous forme d'hémagglutination. Les cellules infectées fixent également les hématies à leur surface ; c'est le phénomène d'hémadsorption. L'hémadsorption, comme l'hémagglutination, implique un lien entre le matériel de revêtement viral et les récepteurs mucoprotéiques des hématies.

Hémadsorption. — Les cultures sont rincées trois fois avec une solution tampon, puis une suspension à 0,5 % d'hématies humaines du groupe 0 leur est ajoutée. Après quelques minutes à température ordinaire, l'hémadsorption est observée au microscope.

Titre hémagglutinant. — La suspension standard d'hématies renferme 0,5 % d'hématies humaines du groupe 0, préalablement lavées trois fois avec du tampon phosphate. Des plateaux de plexiglas du type Salk (1948) ont servi au titrage de l'hémagglutinine des surnageants de cultures témoins et infectées prélevés à des intervalles de 14, 24, 48, 72 et 96 heures après l'infection. Des dilutions successives de raison 2 de surnageant sont préparées dans du tampon phosphate et on ajoute un volume égal de la suspension d'hématies à 0,5 %. On procède à la lecture en observant la disposition des globules sédimentés et en notant le point terminal de l'hémagglutination totale. L'unité d'hémagglutination est la plus haute dilution de virus dans un volume de 0,5 ml causant l'agglutination complète des hématies contenues dans 0,5 ml d'une suspension à 0,5 %.

E. Techniques cytochimiques

Acides nucléiques

Les acides nucléiques jouissent de la propriété de se colorer sélectivement par le mélange de vert de méthyle - pyronine : l'ARN fixe la pyronine, l'ADN fixe le vert de méthyle. La réaction de Feulgen est une coloration de l'ADN autrement sûre et précise que la réaction au vert de méthyle, c'est pourquoi cette dernière méthode n'a pas été envisagée pour étudier l'ADN isolément. La pyronine est un bon colorant pour indiquer la présence d'ARN, mais la coloration n'est pas assez fidèle pour permettre des mesures quantitatives (Lison 1953).

Vert de méthyle - pyronine. — Le vert de méthyle (National Aniline) est lavé plusieurs fois avec du chloroforme pour le débarrasser de son contaminant principal, le violet de méthyle. La pyronine B (National Aniline) est recristallisée plusieurs fois dans l'eau.

Les lamelles sont fixées trois minutes dans l'alcool 95 % puis conservées dans l'alcool 70 % à 4° C. Après hydratation elles sont laissées vingt minutes dans la solution colorante suivante (Leuchtenberger 1950) : 150 mg de vert de méthyle purifié et 83 mg de pyronine B recristallisée dissous dans le mélange contenant 0,5 g de phénol, 20 ml de glycérol et 2,5 ml d'éthanol 95 % amenés à 100 ml avec de l'eau distillée. Les lamelles sont rincées rapidement dans de l'eau glacée, séchées légèrement et différenciées soixante minutes dans deux bains d'alcool butylique tertiaire, puis éclaircies au xylol et montées à l'Eukitt.

Feulgen. — Les cultures sont rincées avec une solution tampon et fixées trois minutes dans l'alcool à 95 %. Après hydratation, les lamelles sont colorées suivant la réaction de Feulgen (Feulgen et Rossenbeck 1924) sous des conditions rigoureusement contrôlées (Leuchtenberger 1958). La coloration optimale est obtenue après une hydrolyse de douze minutes dans HCl 1N à 60° C. L'hydrolyse acide coupe la liaison glycosidique purine-désoxyribose dans la molécule d'ADN. La fonction aldéhydrique libre du désoxyribose réagit avec la leucofuchsine (réactif de Schiff) pour former un composé magenta (Kasten 1960). Cette réaction est stoechiométrique et la coloration suit la loi de Beer-Lambert : ces deux conditions sont nécessaires pour l'analyse quantitative de l'ADN par microspectrophotométrie (Swift et Rash 1956 ; Leuchtenberger 1958).

Protéines

La coloration de Millon n'a pas été trouvée satisfaisante : son intensité est beaucoup trop faible pour s'appliquer aux cultures de tissu. Les groupes aminés libres de différentes protéines fixent de façon stoechiométrique les colorants acides (Singer 1952 ; Deitch 1955 ;

Alvarez et Cowden 1966). La réaction dépend principalement de la nature chimique du colorant, du pH et de la force ionique de la solution colorante. Si la force ionique est trop élevée, les ions du solvant peuvent entrer en compétition avec le colorant pour les groupes aminés libres et modifier de façon non négligeable l'intensité de la coloration (Singer 1952). Si le pH est suffisamment acide, seuls les groupes aminés libres de l'arginine, de la lysine et de l'histidine sont ionisés et fixent le colorant.

Après réaction de Feulgen, les lamelles sont colorées dans les conditions suivantes (Leuchtenberger et coll. 1956) : elles sont placées quinze minutes dans une solution de 0,1 % de Fast Green (National Aniline) dissous dans HCl 0,1N (pH 1,1-1,2). Puis rinçage rapide à l'eau distillée, déshydratation à l'alcool et différenciation dans l'alcool absolu pendant trente minutes. Passage dans le xylol et montage à l'Eukitt. Conduite dans ces conditions, cette méthode a été appliquée avec succès à des coupes de tissu (Schrader et Leuchtenberger 1950) et à la détermination de la quantité d'arginine après réaction de Feulgen dans les spermatozoïdes, où le rapport ADN/arg a été trouvé constant (Leuchtenberger et coll. 1956).

F. La microspectrophotométrie

Le microspectrophotomètre n'est autre qu'un microscope combiné avec un appareil photoélectrique. L'émission lumineuse est fournie par une lampe AH_4 à vapeur de mercure dont la bande verte $\lambda = 546 m\mu$ est sélectionnée par un filtre Wratten 72 (77A + 78). L'éclairage est du type Köhler. Le faisceau lumineux est dirigé sur le condensateur (NA 1,3) du microscope puis traverse la préparation et par un objectif apochromatique à immersion (NA 1,3) plus un oculaire interchangeable atteint le tube photoélectrique. Un prisme amovible permet de dévier le faisceau lumineux dans un binoculaire pour l'observation directe du champ microscopique. L'appareil photoélectrique comprend un miroir déviant la lumière à travers un télescope ; ce dernier permet de focaliser le noyau, de mesurer ses dimensions sur un réseau micrométrique calibré et de délimiter l'ouverture du diaphragme. La rotation d'un miroir renvoie la lumière sur le tube photoélectrique (type RCA 931A) dont le signal est amplifié par un photomultiplicateur électronique (Farrand). L'instrument de lecture est un galvanomètre (Rubicon).

Dosage de l'ADN nucléaire.

La méthode du « plug » introduite par Swift (1950) consiste à mesurer la lumière transmise au travers d'un cylindre central du noyau, dont le diamètre est déterminé par l'ouverture du diaphragme de l'appareil photoélectrique. La mesure de la lumière transmise à travers le noyau

entier a été trouvée empiriquement moins précise (Leuchtenberger 1950 ; Swift 1950). La quantité totale d'ADN dans le noyau entier est calculée par la formule (Swift 1950) :

$$A = \frac{E}{F} \cdot C^2$$

E = extinction = $\frac{1}{\text{transmission}}$

F = fraction du volume nucléaire total occupée par le cylindre central

C = rayon du cylindre central

A côté des erreurs systématiques inhérentes aux appareils, la nature du matériel biologique peut être la source d'autres inexactitudes : erreur distributionnelle, orientation spatiale, facteur de proportionnalité (Swift et Rash 1956 ; Leuchtenberger 1958)). En pratique ces erreurs sont moins significatives que ne le font penser des considérations théoriques. L'efficacité de la méthode a été prouvée à maintes reprises (Leuchtenberger 1958). La microspectrophotométrie après coloration de Feulgen est justifiée pour établir des comparaisons de la quantité relative d'ADN dans des noyaux pris individuellement.

Dans le dosage d'ADN nucléaire des cellules en culture, l'erreur la plus considérable provient de la forme des noyaux. Ces derniers sont en majorité des ellipsoïdes aplatis : deux axes (longitudinal et transversal) sont facilement mesurés et le troisième augmente proportionnellement aux deux autres (Bucher 1954). Cette propriété rend possible les comparaisons caryométriques sur la seule base des surfaces nucléaires, sans qu'il soit nécessaire de calculer le volume nucléaire absolu. Les surfaces nucléaires présentées sur les histogrammes et les tableaux des résultats sont en unités arbitraires. Elle représentent la valeur $r^2\mu$, r étant la moyenne du petit et du grand axe du noyau. Kasten (1956) a établi une formule de correction pour les noyaux ellipsoïdes. Pour la détermination de la quantité d'ADN de cellules en culture, les noyaux ont été traités comme des sphères. On a calculé le diamètre nucléaire moyen (moyenne des axes parallèles au couvre-objet) et appliqué la formule de Swift. Cette méthode est valable pour reconnaître des classes polyploïdes en culture de tissu, mais n'est pas assez précise pour la détermination de la quantité absolue d'ADN.

G. Préparation des chromosomes

In vivo. — La souris est injectée une heure et demie avant le prélèvement du tissu avec 0,5 mg de Colcemide Ciba. Le tissu prélevé est désagréé en petits morceaux dans de l'eau distillée. La durée de ce traitement hypotonique est d'environ quinze minutes dans l'acide acé-

tique à 50 %. L'étalement se fait entre une lame albuminée et une lamelle graissée serrées entre deux à trois épaisseurs de papier buvard et par pression digitale. Les lamelles sont décollées dans l'alcool à 70 %. Coloration au Feulgen.

In vitro. — Le nombre de mitoses est augmenté par un renouvellement du milieu vingt-quatre heures avant le prélèvement des cultures. Quelques subcultures présentant très peu de mitoses ont été prétraitées pendant deux heures avec de la colchicine (10^{-6} g/ml). Pour assurer un bon étalement des chromosomes, les cultures sur lamelles sont traitées par une solution hypotonique contenant 0,05 M de sucrose, $7 \cdot 10^{-4}$ M CaCl_2 et $3 \cdot 10^{-4}$ M MgCl_2 ; cette solution conserve la morphologie des chromosomes (Somers et coll. 1963). Le traitement hypotonique dure cinq à dix minutes, mais dépend de la culture. Le fixateur (1 partie acide acétique et 5 parties d'alcool absolu) est introduit très lentement pour ne pas décoller les mitoses de la lamelle ; il est renouvelé pour éliminer entièrement la solution hypotonique. Après trois à quatre minutes de fixation, les lamelles sont séchées rapidement à l'air et conservées dans l'alcool à 70 %. La coloration de Feulgen assure des préparations permanentes.

H. Photographies

Toutes les microphotographies ont été réalisées avec un appareil ALPA reflex 6c adapté sur un microscope Leitz par un jeu de tubes de rallonge (film : Kodak Panatomic-X).

RÉSULTATS

A. Elevage

Trois couples F_1 de souris de la souche Snell porteurs du gène récessif du nanisme sont à l'origine de l'élevage. Tous les couples sélectionnés par la suite sont descendants de deux couples originaux, une lignée s'étant éteinte à la génération F_2 . Les couples sont choisis parmi les frères et les sœurs d'une portée comprenant une ou plusieurs souris naines. Les souris naines sont stériles (Bartke 1965). Parmi 77 couples sélectionnés, 34 étaient hétérozygotes et ont donné des souris naines. La descendance des couples hétérozygotes, étudiée sur sept générations et pendant une période de vingt-huit mois, est distribuée comme suit : 487 souris normales et 167 souris naines, ce qui correspond au rapport phénotypique théorique 3 : 1 pour un gène allèle récessif.

Les souris naines sont reconnaissables douze à quinze jours après la naissance. A cet âge leurs caractères distinctifs sont un museau plus arrondi que celui des souriceaux normaux, le cartilage des oreilles et de la queue moins développé. Deux à trois semaines après leur naissance, les souris naines arrêtent leur développement, ce qui les distingue nettement des souriceaux normaux. A cet âge le foie des souris normales comparé à celui des souris naines contient des noyaux plus volumineux et présente plus de mitoses ; le rein des souris naines est déjà hypoplasique, mais le volume des noyaux des cellules n'est pas différent.

B. Cytologie comparée des cultures témoins de tissu rénal de souris naines et normales

Sitôt après la mise en culture, les groupes de cellules, provenant en majorité des tubules du cortex rénal, s'attachent au couvre-objet et forment de petites colonies. Par division mitotique, ces colonies s'étendent, deviennent confluentes pour former après quatre à cinq jours de culture une couche d'une seule assise formant un tapis de cellules continu. A ce stade, les cellules subissent l'inhibition de contact et il en résulte une réduction marquée de la division cellulaire. Les cellules sont en majorité de type épithélial avec une forme polyédrique. En quelques endroits de la culture, des cellules de type fibroblastique ont

une croissance entrecroisée et superposée ; l'index mitotique y est en général plus élevé que dans la couche monocellulaire environnante.

La pousse cellulaire s'opère à la même rapidité dans les cultures Dw et Norm. L'observation de 15 expériences avec chaque type de cellules n'a pas fourni de différence significative. Le tableau I donne un exemple de détermination de l'index mitotique de cultures de cinq jours :

Tableau I : **Index mitotique de cultures de cinq jours**

Désignations	N	%P	%M	%A	%T	Index mitotique en %
THO ₉ Dw	5772	1,04	0,31	0,14	0,24	1,74
THO ₁₀ Norm	6021	1,01	0,20	0,12	0,17	1,45

Dw : naine ; Norm : normale ; N : nombre de noyaux ; P : prophase ; M : métaphase ; A : anaphase ; T : télophase.

L'observation au microscope de phase des cultures vivantes vingt-quatre heures après l'ensemencement permet de reconnaître les cultures de souris naines à cause de la petitesse des cellules. Malgré les nombreuses divisions nécessaires à la formation de la culture confluyente, les cultures Dw et Norm montrent une différence stable. Cette dernière se manifeste par des surfaces nucléaires et nucléolaires plus réduites pour les cellules Dw (fig. 1 a-b p. 23). Elle est observable directement au microscope optique sur des cultures fixées et colorées. Des dessins à la chambre claire appuient ces observations. Des mesures caryométriques opérées sur tous les noyaux d'une surface choisie au hasard confirment ce résultat et en donnent une preuve quantitative (tableau II, p. 24). La figure 12 montre par un exemple que les deux populations de noyaux sont différentes et que la surface nucléaire moyenne n'est pas dépendante dans les cultures Norm d'une fréquence plus élevée de cellules polyploïdes. Dans une expérience, après vingt-six jours de culture, les noyaux des cellules Dw et Norm avaient une même surface moyenne, mais elles différaient par la fréquence de ploidie : 12,5 % pour les cultures Dw et 32,5 % pour les cultures Norm (tableau II, THO₁₁ et THO₁₂ p. 24 ; fig. 8 p. 35).

Les surfaces nucléaires augmentent en fonction du vieillissement de la culture (tableau II p. 24) ; ce fait nécessite la comparaison de cultures de même âge appartenant à des expériences parallèles. Cette différence se maintient deux à trois semaines ou même plus dans les cas favorables,

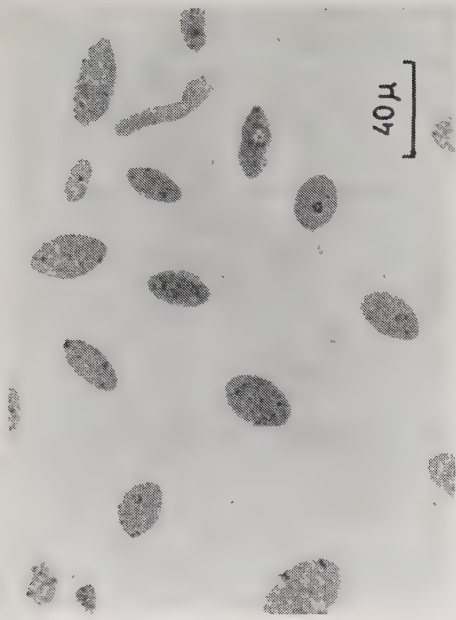
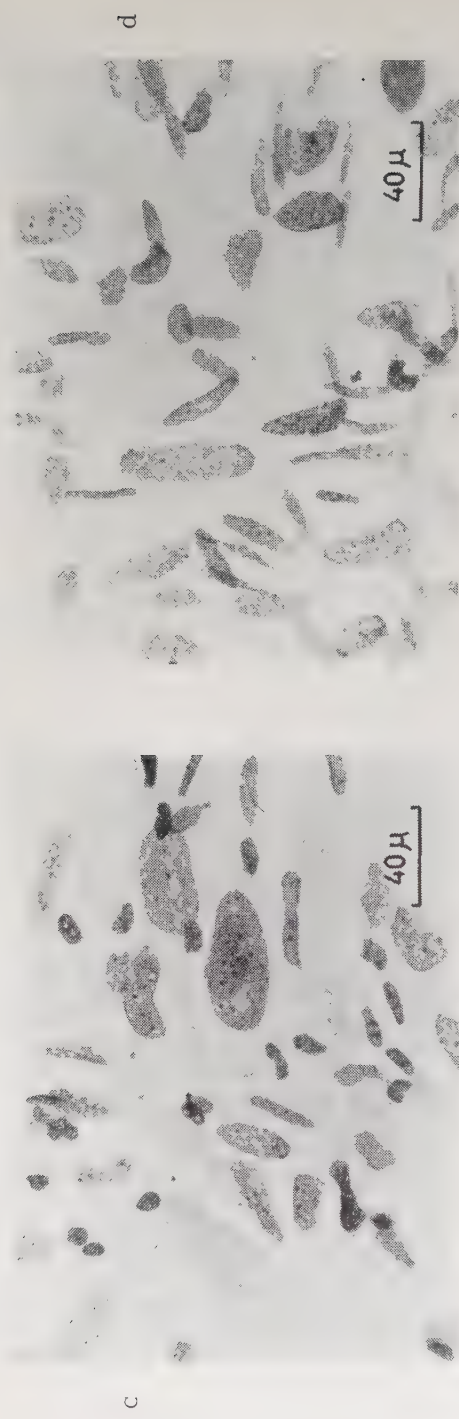
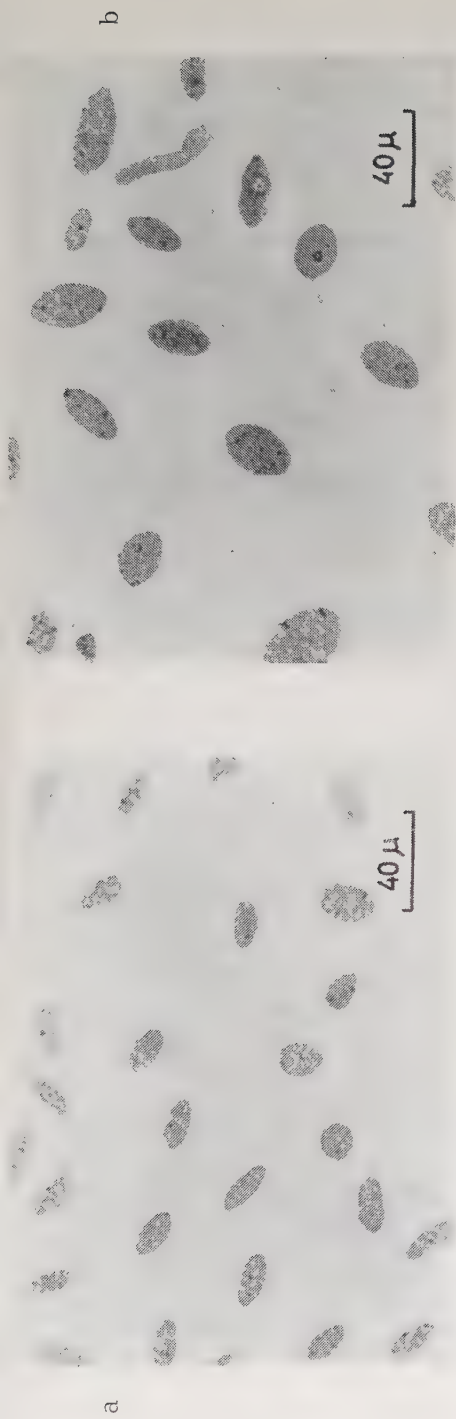


Figure 1. — Cultures témoins (34 jours) et infectées par le PR8 (28 jours après l'infection). a) culture témoin Dw ; b) culture témoin Norm ; c) culture infectée Dw ; d) culture infectée Norm.

Tableau II : Comparaison entre cultures témoins de tissu rénal de souris naines et normales du contenu d'ADN (microspectrophotométrie sur Feulgen) et de grandeur nucléaire mesurés sur des noyaux individuels

Désignations	Age des souris (jours)	Age de la culture (jours)	Nombre de noyaux mesurés	Surface moyenne (μ^2)	Erreur-type	Différence caryométrique *	Différence de polyploïdie ou polyténie estimée par le contenu en ADN
THO ₃ Dw	22-23	5	60	33,0	1,8	oui	oui
THO ₄ Norm	23	5	60	52,0	2,9		
»	»	8	60	44,8	2,5	oui	oui
		8	60	72,5	5,2		
»	»	12	100	50,1	2,3	oui	oui
		12	100	77,0	5,2		
THO ₁₁ Dw	18	5	60	36,8	1,9	oui	oui
THO ₁₂ Norm	21	5	60	46,2	2,5		
»	»	8	60	42,0	2,3	oui	oui
		8	60	53,2	2,3		
»	»	12	60	41,2	2,1	oui	oui
		12	60	50,5	2,6		
»	»	19	60	45,2	2,5	oui	oui
		19	60	56,5	2,7		
»	»	26	40	52,8	3,4	non	oui
		26	40	50,8	2,9		

Désignations	Age des souris (jours)	Age de la culture (jours)	Nombre de noyaux mesurés	Surface moyenne (μ^2)	Erreur-type	Différence Caryométrique *	Différence de polyploidie ou polyténie estimée par le contenu en ADN
THO ₃₉ Dw	17	6	60	30,1	1,5	oui	oui
THO ₄₀ Norm	17	6	60	35,5	1,7		
THO ₂₅ Dw	15	18	60	52,0	2,7	oui	oui
THO ₂₆ Norm	15	18	60	65,5	2,6		
THO ₂₇ Dw	14	18	60	35,5	1,9	oui	non
THO ₃₈ Norm	14	18	60	45,3	2,4		
THO ₁₉ Dw	12-14	19	60	33,5	1,0	oui	oui
THO ₂₀ Norm	12-14	19	60	42,2	1,9		
THO ₉ Dw	21	26	60	40,0	2,5	oui	oui
THO ₁₀ Norm	20	26	60	61,7	4,1		
THO ₁₅ Dw	18	34	60	38,2	2,4	oui	oui
THO ₁₆ Norm	16	34	60	55,0	2,4		
THO ₁₃ Dw	14-19	40	60	31,7	1,3	oui	non
THO ₁₄ Norm	14-19	40	60	61,0	2,4		

* Les méthodes statistiques appliquées pour le calcul des moyennes et de l'erreur-type sont valables pour une distribution normale des valeurs. Les histogrammes de surface nucléaire sont asymétriques et se prolongent dans le sens des valeurs fortes. L'asymétrie n'empêche pas d'employer la moyenne et l'erreur-type, et si elle n'est pas très forte, ces paramètres fournissent des indications utiles.

Pour décider si la différence calculée n'est pas fortuite, les résultats ont été soumis à l'épreuve de signification. On a admis que, si le quotient de la différence entre les deux moyennes par l'erreur-type de la différence est plus grand que 2,5, la différence est significative. Cela revient à dire qu'il y a une possibilité sur 100 pour que la différence soit fortuite (différence au seuil de 1 %).

jusqu'à ce que la culture dégénère. Les cultures âgées présentent plus de cellules anormales que les cultures jeunes. Ce processus conduit à la dégénérescence de la culture qui se manifeste par l'apparition de nombreuses cellules pycnotiques, par des nécroses et par la présence de débris cellulaires dans le milieu de culture.

Deux facteurs influencent l'établissement de cette différence : l'âge des souris et le milieu de culture. Dans une expérience, les souris naines et normales avaient trente-huit jours au moment de l'utilisation de leurs reins pour la culture ; la croissance des cellules a été anormalement lente et aucune différence n'a été observée. Les cellules de souris naines se sont montrées très sensibles à des variations de composition du milieu de culture. Un effet toxique du milieu a été remarqué dans huit expériences ; très peu de cellules adhèrent au couvre-objet ; leur croissance est lente, anormale. Beaucoup de cellules non attachées et des débris nécrotiques flottent librement dans le milieu. Des granulations cytoplasmiques et des altérations nucléaires affectent les cellules. Ce comportement anormal n'a pas été pris en considération et ces expériences ont été éliminées.

C. Effets du virus sur les cultures déterminés par l'hémadsorption et l'hémagglutination

L'hémadsorption des hématies par les cultures montrent que plus du 90 % des cellules synthétisent de l'hémagglutinine vingt-quatre heures après l'infection. L'hémadsorption est faible, et les destructions cellulaires peu importantes sur les cellules de type fibroblastique. Elle est nulle dans les cultures témoins. L'hémadsorption par les cultures infectées diminue progressivement pour disparaître vers le quatorzième jour.

Le taux d'hémagglutinine dans le surnageant a été mesuré à différents temps après l'infection. Il est nul au temps zéro et croît très rapidement entre la quatorzième et la vingt-quatrième heure pour atteindre son maximum vers la soixante-douzième heure. Il n'y a pas de différence entre les cultures Dw et Norm. D'une expérience à l'autre, les courbes de synthèse d'hémagglutinine en fonction du temps sont semblables, mais pas identiques (fig. 2 p. 27).

D. Cytologie des cultures rénales infectées avec le virus PR8

L'action du virus influenza de la souche PR8 sur les cultures de tissu rénal de souris naines et normales a été spécialement étudiée sur huit expériences. Le résultat principal de cette investigation est que le virus produit des effets identiques sur les deux types de tissu. Les effets cytopathogènes du virus n'apparaissent pas simultanément dans toutes

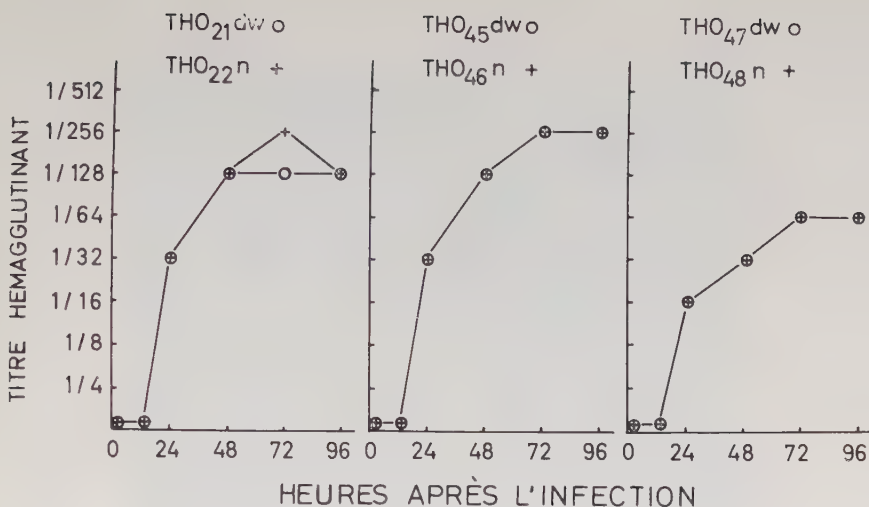


Figure 2. — Titre hémagglutinant du surnageant de cultures Dw et Norm à différents temps après l'infection par le PR8.

les cellules de la culture et toutes les cellules ne réagissent pas identiquement. Néanmoins, la réponse cellulaire est divisée en deux phases distinctes se succédant aux environs du troisième jour après l'infection : la première caractérisée par les destructions cellulaires dues aux effets cytopathogènes du virus, la seconde par une prolifération cellulaire intense.

L'observation au microscope de phase des cultures vivantes permet de reconnaître un agrandissement des nucléoles et des noyaux dans les vingt-quatre premières heures après l'infection. Cette manifestation de l'activité virale coïncide avec les premières destructions cellulaires qui augmentent graduellement jusqu'à soixante-douze heures après l'infection. La morphologie des noyaux infectés est profondément transformée. Les changements comprennent une altération de la chromatine ; elle est distribuée irrégulièrement et grossièrement dans le noyau qui prend un aspect ballonné, vacuolisé (fig. 3 p. 28). Les nucléoles s'agrandissent et leur contour devient souvent diffus. Leur nombre augmente, deux à cinq par noyau infecté et seulement un à deux par noyau témoin. Les mitoses sont arrêtées ou détruites. Environ trois jours après l'infection, une altération de la membrane nucléaire est observée dans certaines cellules binucléées. Le contour net de la membrane nucléaire s'estompe et les deux noyaux tendent à fusionner (fig. 3 p. 28 ; fig. 4 a p. 29).

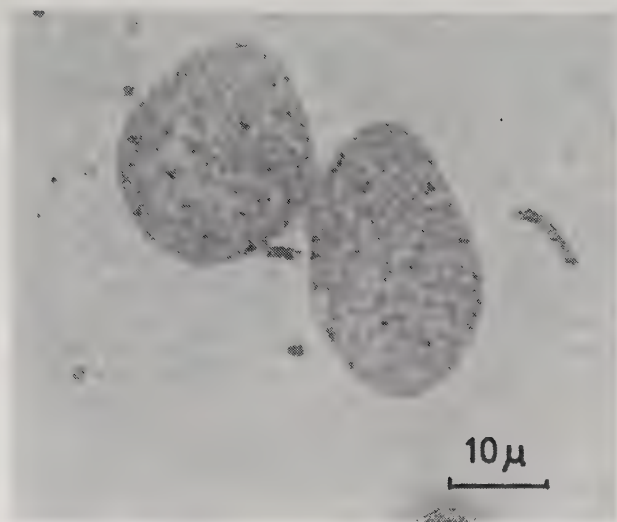


Figure 3. — Altération de la chromatine et de la membrane des noyaux infectés par le PR8.

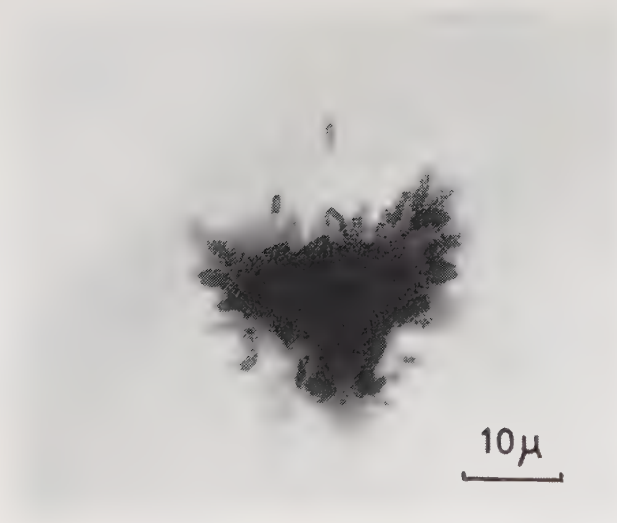
a-c : noyaux Dw ; a'-c' : noyaux Norm.

a, a' : cultures témoins de 9 jours.

b-c, b'-c' : cultures trois jours après l'infection.



a



b

Figure 4. — a) Altération de la membrane nucléaire dans une cellule binucléée. Culture Norm trois jours après l'infection par le PR8.
b) Mitose anormale. Culture Dw vingt et un jours après l'infection par le PR8.

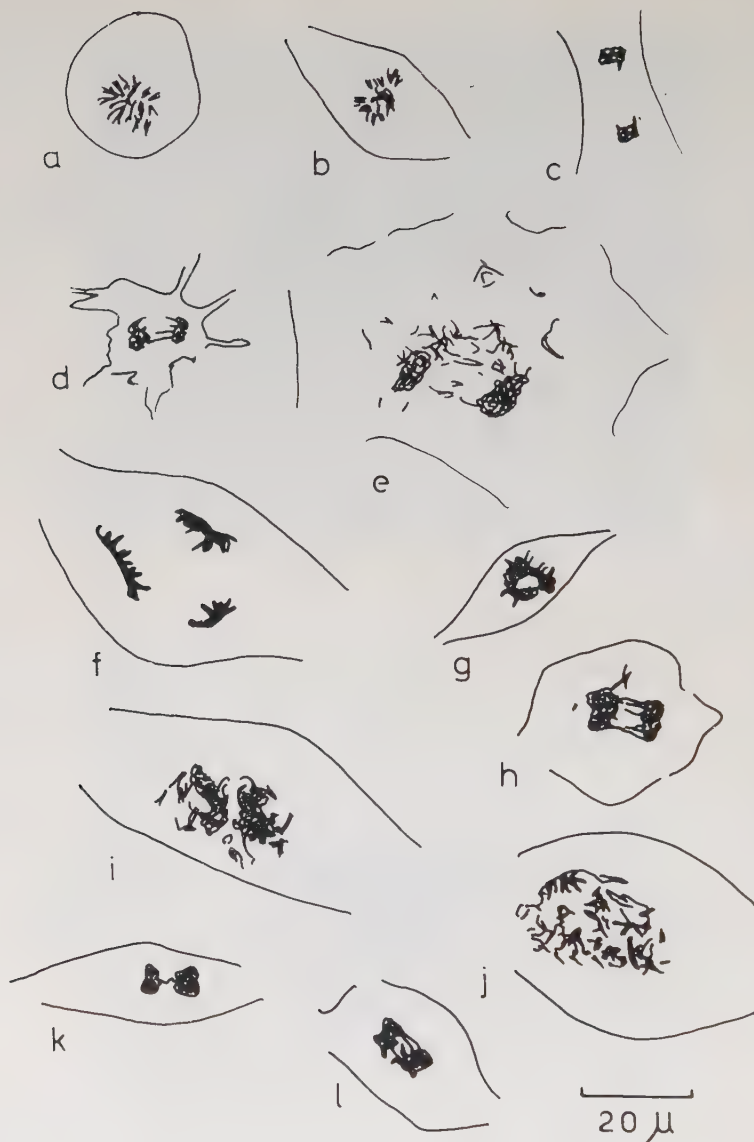


Figure 5. — Figures mitotiques normales et anormales.

a-c : cultures témoins de sept jours ;
d-l : cultures sept jours après l'infection par le PR8 ;
a, g, h, i, k, l : cultures Norm ;
b, c, d, e, f, j : cultures Dw.

Trois jours après l'infection, les cultures manifestent un changement complet. L'index mitotique augmente fortement et la croissance cellulaire reprend suivant un mode altéré : les cellules de type fibroblastique se superposent, s'entrecroisent et perdent complètement l'inhibition de contact caractérisant les cultures témoins. La stimulation mitotique est particulièrement évidente sur les cellules présentant un type fibroblastique déjà avant l'infection et synthétisant peu d'hémagglutinine. Le polymorphisme nucléaire s'accroît (fig. 1 c-d p. 23). Les mitoses anormales sont beaucoup plus fréquentes que dans les cultures témoins où elles apparaissent spontanément. Les anomalies comprennent surtout des ponts anaphasiques, la perte d'un chromosome entier dans le cytoplasme et plus rarement des mitoses tripolaires (fig. 4 b p. 29 ; fig. 5 p. 30). En dehors de ces zones de croissance, des cellules épithélioïdes survivent à l'infection, mais ne se divisent pas activement. Leur noyau devient très volumineux. Des noyaux monstrueux se forment à côté de ce type de cellule.

L'étude cytologique à long terme des cultures de tissu rénal de souris normales infectées par le PR8 permet l'observation de noyaux monstrueux décrits pour la première fois par Leuchtenberger et coll. en 1965. Ces mêmes noyaux anormaux se forment dans les cultures Dw après l'infection. Comparés aux cultures Norm, le temps et la fréquence de leur formation, quoique variables d'une culture à l'autre, sont semblables en moyenne. On ne trouve pas de différence dans leur forme ou leur dimension ; de nombreux dessins à la chambre claire confirment ce résultat (fig. 6 p. 32). Ils apparaissent quatorze à vingt et un jours après l'infection dans les zones de raréfaction, à fortes destructions cellulaires ; mais ensuite ils sont noyés par la masse des cellules en prolifération. Leur forme est extrêmement variable et bizarre, comprenant des lobulations secondaires. La majorité de ces noyaux aberrants se présentent grossièrement sous forme de deux masses nucléaires en relation par un pont de chromatine plus ou moins important. Ils sont entourés de nombreux micronoyaux caractéristiques des cellules déséquilibrées dans leur structure chromosomique. Leur chromatine est grossière et irrégulièrement distribuée. Une unique observation d'un de ces noyaux en activité mitotique suggère que certaines étapes de la mitose peuvent encore s'effectuer (fig. 7 p. 33).

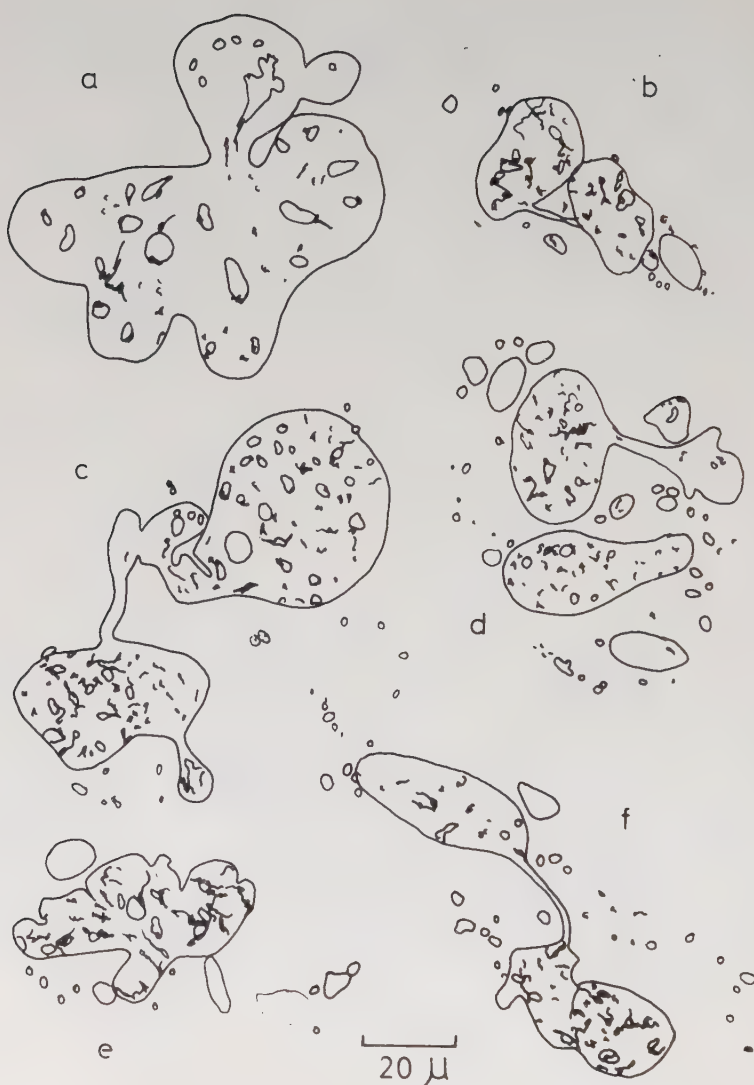


Figure 6. — Noyaux monstrueux apparus quatorze à vingt et un jours après l'infection par le PR8.

a-c : cultures Dw ; d-f : cultures Norm.



20 μ

Figure 7. — Noyau monstrueux en activité mitotique. Culture Norm vingt et un jours après l'infection par le PR8.

E. Comparaison du comportement de l'ADN dans les cultures témoins et infectées de tissu rénal de souris naines et normales

Cultures témoins. — Dans les cultures témoins, les noyaux des cellules composant une couche monocellulaire ont été soumis à un dosage microspectrophotométrique de leur contenu en ADN. Ces cellules sont caractérisées par l'inhibition de contact qui se manifeste par un arrêt presque total des mitoses. Chaque histogramme est basé sur le dosage d'ADN dans 40 à 100 noyaux représentant toutes les cellules d'une surface de culture choisie au hasard. Les mesures quantitatives portent sur un total d'environ 2200 noyaux provenant de 40 cultures de cinq à quarante jours, et représentant 21 expériences.

Parmi les 15 comparaisons exposées sur le tableau II (p. 24), 13 montrent une différence : les cultures Norm présentent une fréquence plus élevée de noyaux dépassant la valeur diploïde $2C$ (fig. 8 p. 35). Les deux cas où cette différence est absente sont présentés sur la figure 9 (p. 36). Ils appartiennent à des cultures âgées. On constate cependant que les noyaux sont plus volumineux dans les cultures Norm. Les mesures microspectrophotométriques sur une sélection des plus grands noyaux permettent d'aboutir aux mêmes conclusions (fig. 10-11

pp. 37-38. Dans le cas des cultures THO₁₉Dw et THO₂₀Norm (fig. 11), la distribution des valeurs d'ADN est à peu près identique, mais le graphique de la figure 12 (p. 39) rapportant les valeurs d'ADN en fonction de la surface nucléaire montre deux populations distinctes, les noyaux de la culture Norm étant plus volumineux.

Comme pour les surfaces nucléaires, seuls les noyaux appartenant à des cultures du même âge doivent être comparés, parce que la fréquence des valeurs fortes d'ADN augmente avec l'âge de la culture (fig. 8 p. 35).

Cultures infectées. — Dans les cultures infectées, les noyaux présentent un pléomorphisme important, ce qui rend la détermination d'ADN moins précise. Il est possible de reconnaître deux types de noyaux : premièrement les noyaux qui se divisent très activement ; ils appartiennent à des cellules fibroblastiques et gardent des dimensions normales ; leur contenu en ADN est compris principalement entre 2C et 4C, conformément aux tissus en intense division (fig. 8 p. 35). Le second type rassemble tous les noyaux très volumineux ne se divisant pas activement et appartenant à des cellules épithélioïdes. Ils contiennent des quantités d'ADN anormalement élevées par rapport aux cultures témoins. Les mesures microspectrophotométriques sur une sélection des plus grands noyaux des cultures infectées ne montrent pas de différence reproductible entre cellules Dw et Norm infectées, mais la ploïdie est très élevée. Dans les cultures témoins, les dosages d'ADN sur une sélection identique des noyaux révèlent une différence entre culture Dw et Norm (fig. 10 à 12 pp. 37 à 39).

Le dosage microspectrophotométrique de l'ADN dans les noyaux monstrueux n'est qu'approximatif à cause des erreurs dues à leur forme et à la distribution irrégulière de leur chromatine, mais il permet d'évaluer un contenu en ADN très supérieur aux plus grandes valeurs détectées dans les cultures témoins.

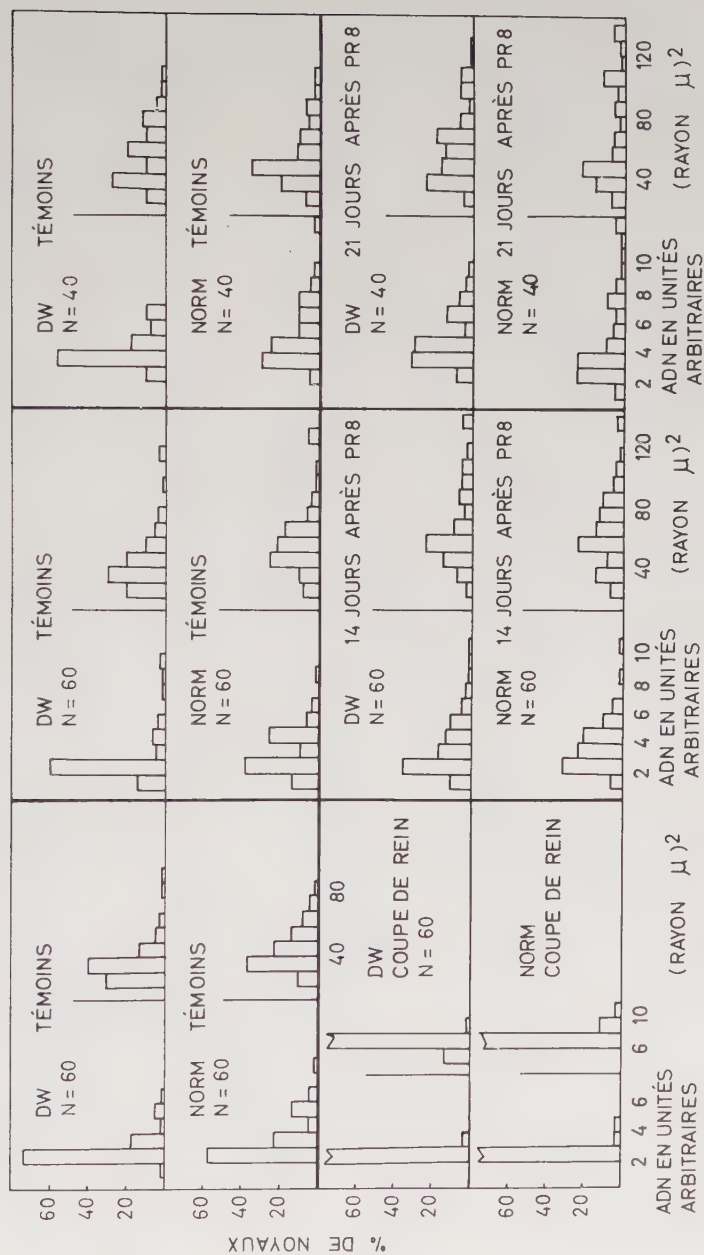
F. Cytochimie de l'ARN et des protéines

Coloration au vert de méthyle - pyronine. — La comparaison des cultures témoins Dw et Norm n'a pas permis de constater une différence d'intensité ou de sélectivité de la coloration au vert de méthyle - pyronine. Par contre, dans les cultures infectées, le premier événement cytochimique qui accompagne l'agrandissement du nucléole est sa très grande affinité pour la pyronine ; mais cette coloration ne permet pas d'attribuer cette accumulation d'ARN à la présence d'un ARN viral ou cellulaire. Ensuite le cytoplasme se colore plus intensément que dans les cultures témoins, donnant à certaines cellules un aspect caracté-

ÂGE DES CULTURES : 5 JOURS

19 JOURS

26 JOURS



N = NOMBRE DE NOYAUX MESURÉS

Figure 8. — Contenu en ADN (microspectrophotométrie sur Feulgen) et surface nucléaire mesurés sur des noyaux individuels de cultures témoins et infectées par le PR8, à différentes périodes. Expériences THO₁₁Dw et THO₁₂Norm.

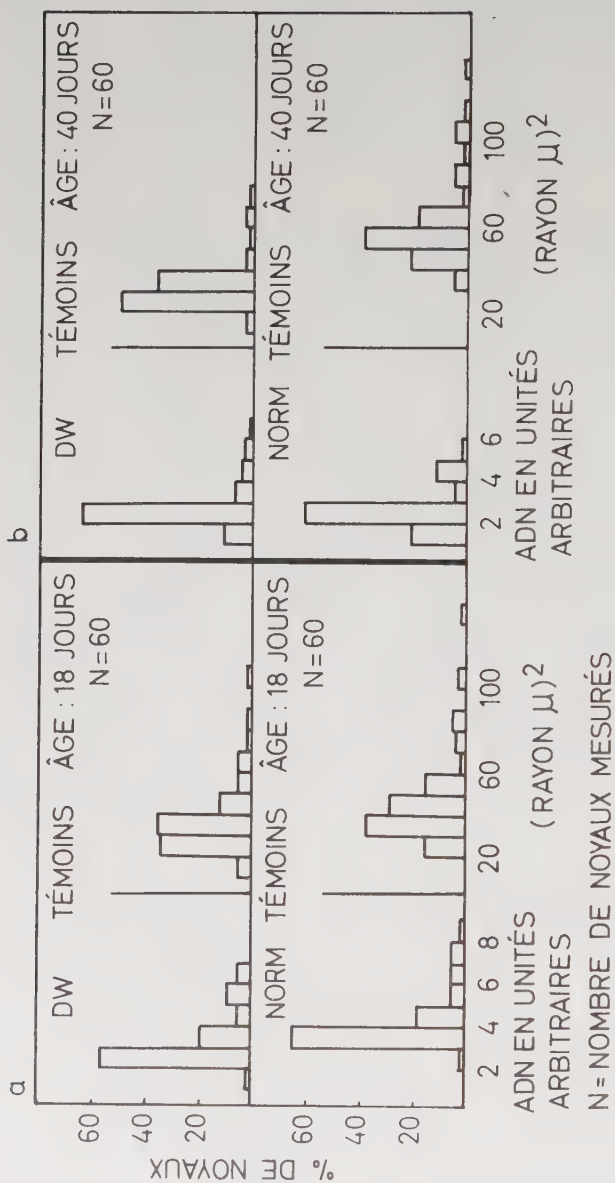


Figure 9. — Histogramme de deux expériences montrant que pour une même distribution d'ADN mesuré sur des noyaux individuels, les noyaux des cellules Norm sont plus volumineux.

a : expérience THO₂₇Dw — THO₂₈Norm ;
b : expérience THO₁₃Dw — THO₁₄Norm.

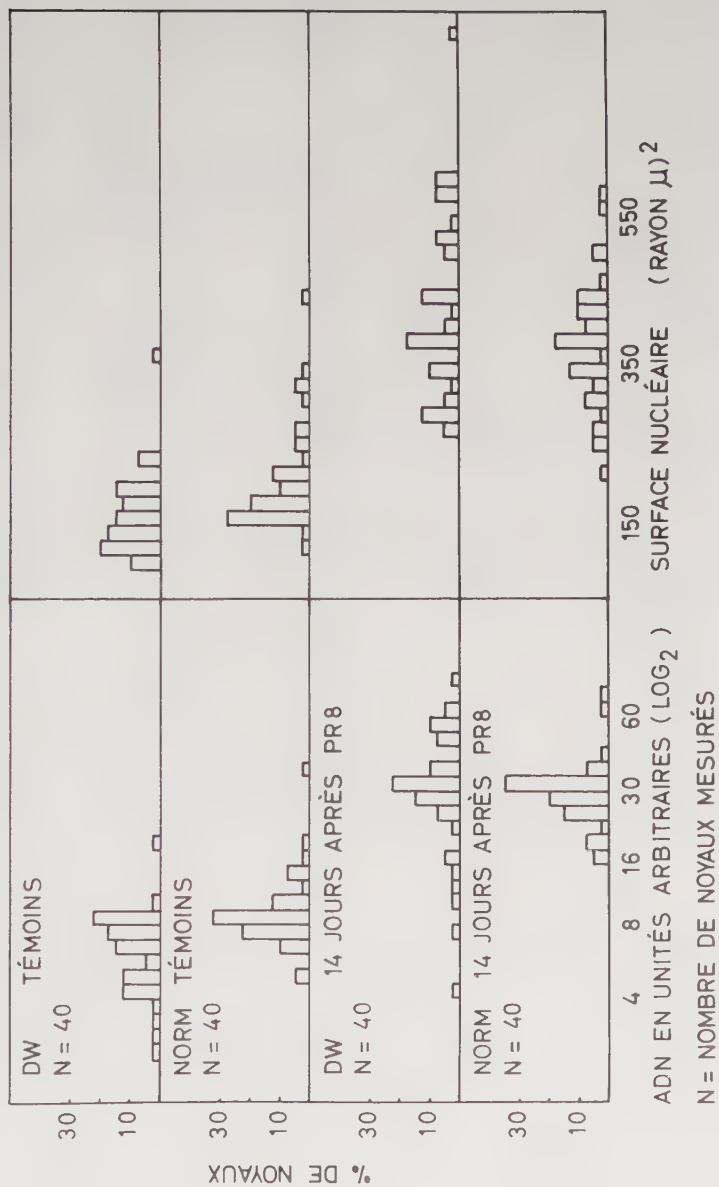


Figure 10. — Contenu en ADN (microspectrophotométrie sur Feulgen) et surface nucléaire d'une sélection des plus grands noyaux des cultures THO₄₅Dw et THO₄₆Norm témoins et infectées par le PR8.



Figure 11. — Contenu en ADN (microspectrophotométrie sur Feulgen) et surface nucléaire d'une sélection des plus grands noyaux des cultures THO₁₈Dw et THO₉₀Norm témoins et infectées par le PR8.

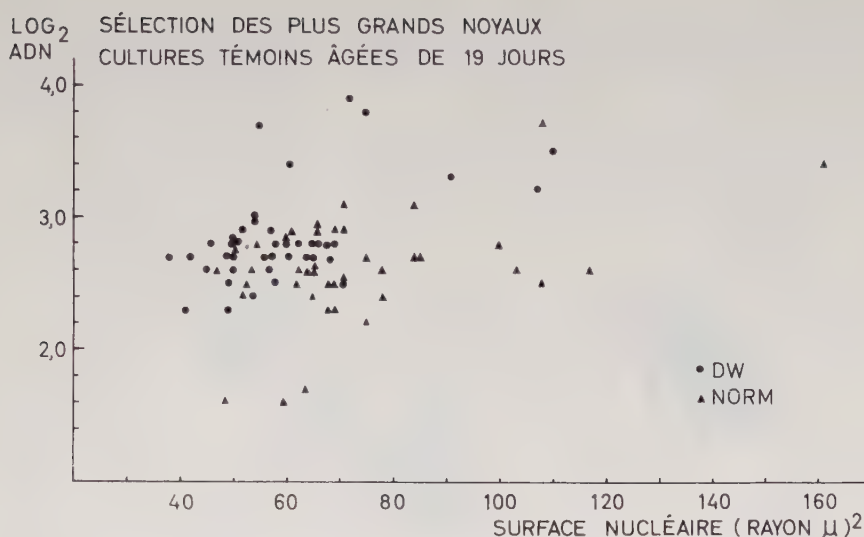


Figure 12. — Relation entre le contenu en ADN (microspectrophotométrie sur Feulgen) et la surface nucléaire mesurée sur des noyaux individuels des cultures témoins THO₁₉Dw et THO₂₀Norm. Comparer avec l'histogramme de la figure 11 p. 38.

ristique (fig. 13 p. 40). La distribution de l'ARN est homogène, mais assez bien délimitée autour du noyau. Au cours des semaines qui suivent l'infection, pendant lesquelles les cultures prolifèrent activement, les nucléoles et le cytoplasme sont toujours bien colorés par la pyronine.

Coloration des protéines. — La coloration des protéines avec le Fast Green FGF à un pH acide n'a pas montré de différence entre cultures témoins Dw et Norm. La répartition de ces protéines après l'infection est topologiquement identique à celle de l'ARN dans les mêmes conditions (fig. 13 p. 40). Les nucléoles se colorent très bien, et ensuite dans certaines cellules, le cytoplasme entourant immédiatement le noyau.

Les études quantitatives par microspectrophotométrie montrent que la coloration intense des nucléoles après infection n'est pas une simple conséquence de leur agrandissement, mais que réellement la concentration en protéines est augmentée. Une sélection des plus grands nucléoles de cellules témoins et infectées (marquées avec des érythro-



Figure 13. — Répartition de l'ARN (a-b) et des protéines (c-d) dans des noyaux infectés par le PR8, trois jours après l'infection.

a et c : culture Dw ; b et d : culture Norm.

cytes) a été mesurée : l'extinction des nucléoles rapportée en fonction de leur surface donne une représentation de leur concentration en protéines (fig. 14 p. 41).

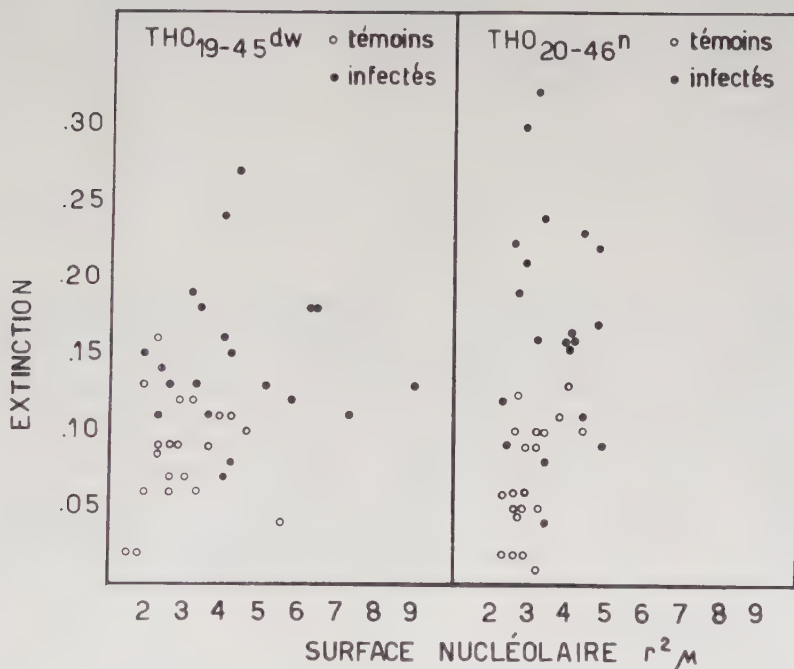


Figure 14. — Extinction des nucléoles en fonction de leur surface mesurée dans des cellules individuelles de cultures Dw et Norm, témoins et infectées par le PR8, trois jours après l'infection. Coloration des protéines (Fast Green à pH acide).

G. Etablissement et étude des subcultures

Les cellules de première explantation présentent une adaptation temporaire en milieu artificiel in vitro. Après quelques semaines, la division mitotique se fait rare ; la culture primaire dégénère au bout de quelques mois. Cependant dans quelques cas, les cellules croissant lentement sont soudainement recouvertes par un nouveau type de cellules à prolifération rapide et indéfinie. Cette transformation morphologique apparaît multifocalement. Les fréquences de son apparition sont notées dans le tableau III.

**Tableau III : Fréquence de la transformation morphologique
dans les cultures Dw et Norm, témoins et infectées**

Type de culture	Fréquence de transformation (transformation / total des essais)	
	Cultures témoins	Cultures PR8
Dw	1/8	1/8
Norm	3/8	4/7

Les cultures Norm montrent une fréquence de transformation morphologique plus élevée que les cultures Dw. Dans les cultures Dw, l'infection par le PR8 ne modifie pas la faible fréquence de transformation observée dans les cultures témoins. La petite différence entre cultures Norm témoins et infectées n'est pas très significative étant donné le faible nombre des essais.

La transformation s'opère dans les cultures primaires ou après quelques repiquages qui ne sont effectués que pour les cultures à croissance rapide. Le délai d'apparition de la transformation morphologique a tendance à être plus court pour les cultures infectées par le PR8, et d'une manière plus générale, pour les cultures à croissance rapide en début d'explantation.

Les subcultures continues ont été comparées en utilisant les trois critères suivants (tableau IV p. 43) : 1. vitesse de croissance ; 2. irrégularités nucléaires ; 3. nombre chromosomique. Une seule subculture, THO₄₆Norm témoin, n'a pas pu être analysée à cause de sa perte accidentelle.

La vitesse de croissance a été étudiée par comparaison de la pousse cellulaire dans des subcultures entre le huitième et le dix-neuvième repiquage et à différents temps après la trypsination. Ces subcultures subissent un temps identique de trypsination et sontensemencées avec la même concentration cellulaire. Elles sont récoltées après sept, quatorze et vingt et un jours. Pour chaque période, les anomalies nucléaires ont été comptées sur la base de 1500 à 3000 noyaux. Ces irrégularités comprennent les micronoyaux et les bourgeonnements nucléaires, comme représenté sur la figure 15 (p. 43). La comparaison de toutes les subcultures présentées sur le tableau IV donne des fréquences d'irrégularités variant entre 1,5 et 5 %, augmentant plus ou moins proportionnellement au nombre de chromosomes. Aucune différence fondamentale ne sépare les cultures témoins et infectées, les cultures Dw des cultures Norm.

Tableau IV : Vitesse de croissance, irrégularités nucléaires et nombre chromosomique des subcultures

Désignations des subcultures	Vitesse de croissance	Irrégularités nucléaires %	Nombre chromosomique
THO ₂₈ Norm tém *	++	3,2	52-59
THO ₁₄ Norm tém	+	2,1	61-70
THO ₄₅ Dw tém	++	3,1	59-73
THO ₁₆ Norm PR8	+++	2,2 4,1	39-41 57-69
THO ₁₈ Norm PR8	+++	1,6	45-54
THO ₄₆ Norm PR8	+++	4,1	61-69
THO ₄₄ Norm PR8	++	4,1	66-78
THO ₄₃ Dw PR8	+	5,1	70-84

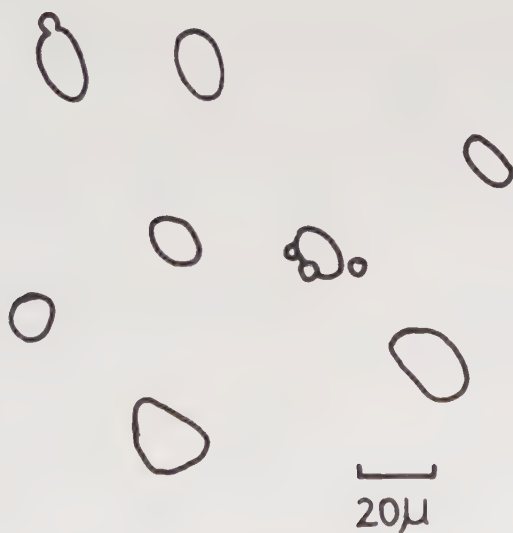


Figure 15. — Surface représentative d'un huitième repiquage de la subculture THO₄₃Dw PR8 montrant des irrégularités nucléaires (bourgeonnement et micronoyaux).

Le comptage des chromosomes a donné des résultats très variables d'une subculture à l'autre (fig. 16 p. 45) ; les caractéristiques principales sont résumées dans le tableau V (p. 44) ; 100 métaphases de chaque subculture ont été dessinées à la chambre claire avec un facteur d'agrandissement d'environ 1300.

Toutes les subcultures sont fortement aneuploïdes et le nombre de chromosomes varie dans certaines limites. Chaque subculture com-

Tableau V : Etude chromosomique des subcultures

Désignations des subcultures	Nombre chromosomique pseudodiploïde			Remarques
	Limites extrêmes	Moyenne	V %	
THO ₂₈ Norm tém	52-59	55,5	2,8	—
THO ₁₄ Norm tém	61-70	66,9	2,7	—
THO ₄₅ Dw tém	59-73	67,1	3,4	Fragments de chromosomes. 39 % de métaphases avec 1-2 chromosomes métacentriques.
THO ₁₆ Norm PR8	39-41	40,1	1,7	Changement du nombre chromosomique dans une 9 ^e subculture.
	57-69	64,0	4,1	
THO ₁₈ Norm PR8	45-54	50,2	4,3	12 % de métaphases avec un chromosome métacentrique. Diplochromosomes.
THO ₄₆ Norm PR8	58-69	64,4	3,2	Chromosomes très longs ou en anneau. 40 % de métaphases avec un chromosome métacentrique.
THO ₄₄ Norm PR8	66-78	73,3	3,1	—
THO ₄₃ Dw PR8	70-84	77,1	3,6	Nombreux fragments de chromosomes uniques ou doubles.

V : variance.

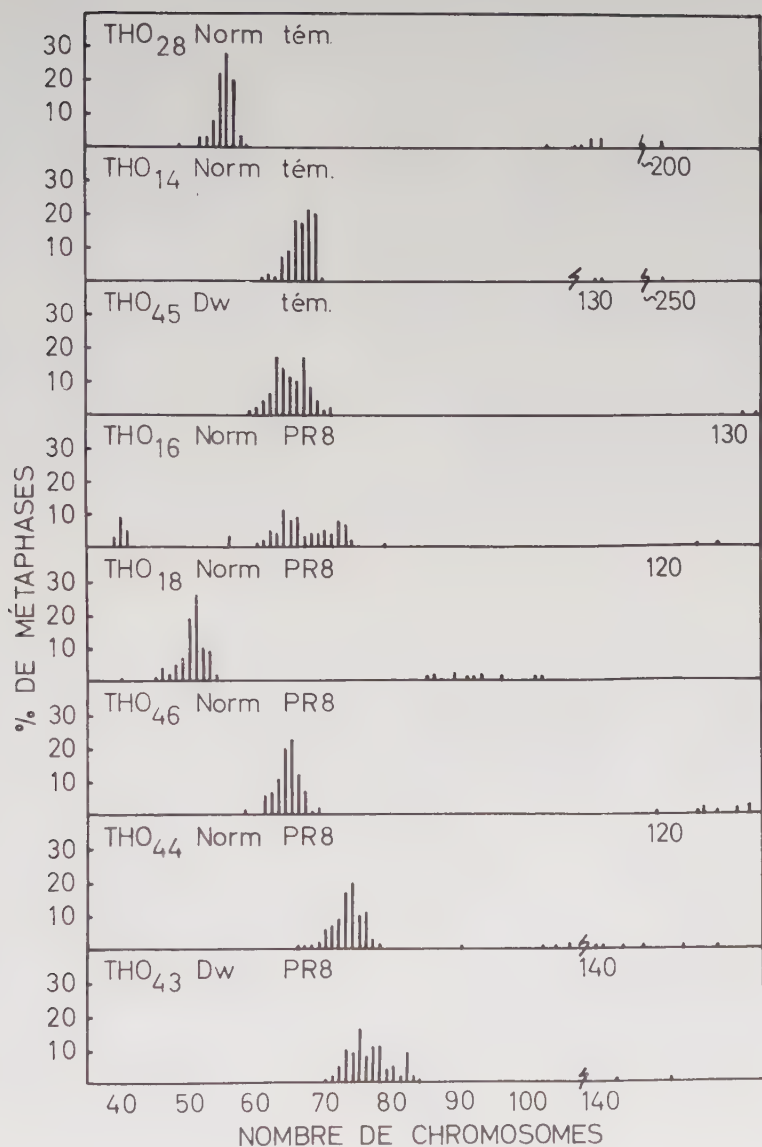


Figure 16. — Nombre chromosomique des subcultures témoins et infectées par le PR8. Comptage sur 100 métaphases par subculture.

prend dans son caryogramme un à deux fragments de chromosomes uniques ou doubles. Cependant, dans les subcultures THO₄₅Dw tém et THO₄₃Dw PR8, le nombre de fragments est notablement plus élevé, soit trois à cinq par métaphase. Le caryotype normal de la souris ne comprend que des chromosomes télocentriques. Dans toutes les subcultures des chromosomes métacentriques sont observés passagèrement et très rarement. Deux subcultures infectées à l'origine par le PR8 ont montré une fréquence élevée de figures métaphasiques avec un chromosome métacentrique, THO₁₈Norm PR8 et THO₄₆Norm PR8 avec respectivement des fréquences d'apparition de 12 % et 40 %. La subculture THO₄₅Dw tém comprend également 39 % de métaphases avec un à deux chromosomes métacentriques. La subculture THO₄₆Norm PR8 montre parfois des chromosomes en anneau (fig. 17 a-b p. 47). Des métaphases avec des diplochromosomes ont été observées seulement dans la subculture THO₁₈Norm PR8 (fig. 17 c p. 47). Un autre événement anormal est le changement du nombre pseudo-diploïde de la subculture THO₁₆Norm PR8 dans le sens d'une réduction ; il passe d'une valeur hypotétraploïde à une valeur diploïde. Notons encore que la variance du nombre chromosomique est en moyenne plus élevée pour les subcultures infectées, mais le genre des irrégularités varie d'une subculture à l'autre.

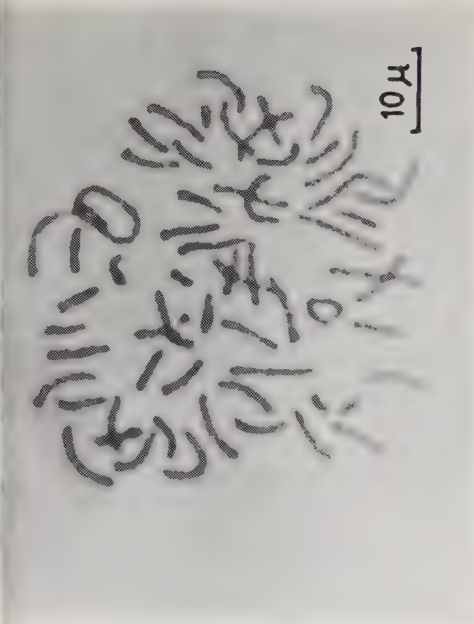
Les subcultures suivantes ont été injectées dans la cavité thoracique de souriceaux nouveaux-nés à raison de $1-2 \cdot 10^5$ cellules par individu : THO₁₄Norm tém 8^e subculture ; THO₁₆Norm PR8 8^e, 9^e et 10^e subcultures ; THO₁₈Norm PR8 8^e et 14^e subcultures ; THO₄₃Dw PR8 6^e subculture. Aucune tumeur n'a été observée dans la période de cinq à neuf mois après l'injection, selon les expériences.

La subculture THO₁₄Norm tém a été établie à partir du même lot de cellules dont provient une subculture Norm PR8 (TB₄₇S₇₂) appartenant à un autre groupe d'expériences*. Après un trentième passage in vitro, cette subculture PR8 transplantée chez des souriceaux a provoqué l'apparition de tumeurs subcutanées. L'analyse chromosomique a révélé deux sortes de tumeurs. L'une a un nombre chromosomique dans la région diploïde, et deux chromosomes métacentriques et un fragment de chromosome sont régulièrement observés (fig. 17 d p. 47). Les tumeurs du second type sont hypotétraploïdes avec six à huit chromosomes métacentriques et également un nombre variable de fragments de chromosomes. Les analyses du nombre chromosomique sont le résultat d'études in vivo et in vitro.

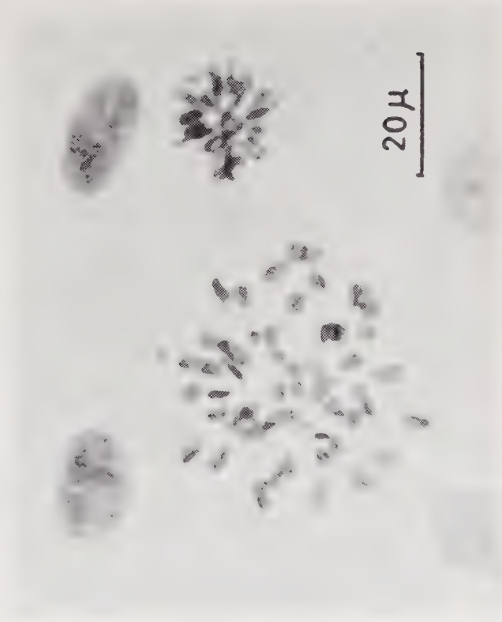
* Leuchtenberger et coll. (manuscrit en préparation).



a



b



c



d

Figure 17. -- a) métaphase pseudotétraploïde avec un chromosome très long et un autre en anneau (subculture THO₄₆Norm PR8) ; b) métaphase pseudodiploïde avec un chromosome très long et un autre en anneau (THO₄₆Norm PR8) ; c) métaphase avec diplochromosomes (subculture THO₄₆Norm PR8) ; d) métaphase d'une tumeur (voir texte p. 46)

DISCUSSION

A. Différenciation des cellules *in vivo* avant la mise en culture

Les noyaux des cellules du rein sont essentiellement diploïdes et ont un volume nucléaire identique chez les jeunes souris naines et normales. C'est une confirmation des résultats obtenus par Leuchtenberger et coll. (1954 a) pour des souris plus âgées de la même souche. L'injection d'hormone somatotrope ne modifie pas cette similarité dans le rein, alors que, sous les mêmes conditions, le foie montre des changements importants (Leuchtenberger et coll. 1954 a). Dans le rein, l'action de l'hormone somatotrope sur la polyploïdie et le volume nucléaire est inhibée ; les changements initiés dans d'autres organes n'ont pas la possibilité de s'y manifester. Par contre, le rein des souris naines est considérablement hypoplasique comme celui des souris hypophysectomisées (Tuchmann-Duplessis 1956). La manifestation du nanisme est relativement tardive, soit environ douze jours après la naissance. Cela peut être expliqué par le fait que le développement embryonnaire semble autonome, tandis que la croissance juvénile est soumise à une régulation hypothysaire très stricte (Tuchmann-Duplessis 1956). Chez la souris naine le manque d'hormone somatotrope pendant la croissance produit une différenciation de l'organisme entier, et en particulier du foie et du pancréas où la polyploïdie n'apparaît pas (Leuchtenberger et coll. 1954 a). Cette hormone ne semble pas agir sur les phénomènes locaux de la cicatrisation ou de la régénération ; c'est le sujet de discussion du paragraphe suivant.

Walker (1958) a trouvé des valeurs très fortes d'ADN dans l'épithélium de la vessie urinaire chez la souris naine et conclut que l'hormone somatotrope n'est pas indispensable pour la polyploïdie, contrairement à de nombreux autres travaux. Sur la base de 15 et 40 déterminations microspectrophotométriques d'ADN sur des noyaux individuels, il établit que chez les souris normales et naines les valeurs d'ADN sont groupées en classes distinctes, indiquant la présence de polyploïdie. L'observation histologique de cet épithélium montre fréquemment des figures de noyaux en voie de fusion. La mesure par l'auteur de cette thèse de 200 noyaux de l'épithélium de la vessie urinaire de souris naine et normale n'a pas mis en évidence des classes définies, bien que la majorité des noyaux ont la valeur tétraploïde ; les histogrammes révèlent la synthèse continue d'ADN dans cet épithé-

lium (fig. 18 p. 50). La souris normale présente quelques valeurs d'ADN plus élevées que la souris naine, et une surface nucléaire moyenne plus grande ($r^2\mu$: $22,4 \pm 1,3$ et $17,6 \pm 1,1$ respectivement) ; cependant cette différence n'est pas très significative parce que tous les noyaux mesurés n'ont pas été choisis absolument au hasard. Un examen plus approfondi des coupes a permis de découvrir la présence de prophases, sans destruction de la membrane nucléaire. Les noyaux ont une activité mitotique partielle et une tendance à fusionner, ce qui explique les grandes valeurs d'ADN. Ce processus n'est pas à comparer à la véritable polyploïdie du foie. La conclusion de ces observations est que l'épithélium montre un remplacement continu de cellules qui dégèrent et disparaissent dans la lumière de la vessie urinaire par desquamation. Cela est en accord avec l'observation que l'hormone somatotrope ne semble pas intervenir dans le déterminisme de la cicatrisation, ni dans les phénomènes de régénération (Tuchmann-Duplessis 1956).

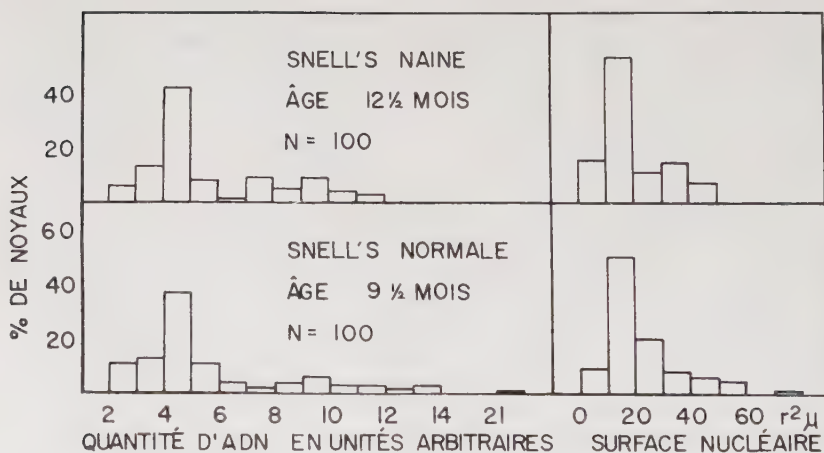


Figure 18. — Quantité d'ADN dans les noyaux de l'épithélium de la vessie urinaire de souris naine et normale, et surface nucléaire (rayon en microns)². N = Nombre de noyaux mesurés.

B. Différenciation des cellules *in vitro*

a) *Dimensions nucléaires et polyploidie in vitro*

Comparés à ceux des souris naines et pour une teneur identique en ADN, les noyaux des cellules de culture de souris normales sont plus grands et présentent une variabilité plus prononcée. Cela montre que le volume nucléaire dépend de l'état physiologique de la cellule, ou de sa différenciation proprement dite, et non pas de son contenu en ADN. Une preuve particulièrement convaincante de cette indépendance a été fournie par Schrader et Leuchtenberger (1950) : ils observent chez un insecte des classes de volume nucléaire associées à un contenu en ADN constant. On sait maintenant que le volume des noyaux est associé à l'état fonctionnel de la cellule et dépend de leur contenu en protéines non-histone (Leuchtenberger et Schrader 1951 ; Alfert et coll. 1955 ; Bachmann 1965). Sur la base de ces résultats on peut affirmer que sous l'influence de l'hormone somatotrope les cellules de souris normales acquièrent d'autres propriétés que celles des souris naines. Cette différenciation physiologique nucléaire est gardée dans les cultures de première explantation.

Des souris trop âgées au moment de l'utilisation de leurs reins et un milieu mal équilibré sont deux facteurs qui empêchent cette différenciation de se manifester *in vitro*. Il est probable que dans ces conditions seules certaines cellules sélectionnées à cause de leur résistance, étant peut-être moins différenciées ou prédisposées à une multiplication active *in vitro* (Sato et coll. 1960 ; Zaroff et coll. 1961). On sait d'autre part que les cellules d'individus âgés croissent difficilement en culture de tissu (John 1965).

Les cultures de rein contiennent un certain nombre de noyaux appartenant à des classes d'ADN multiples. Ce phénomène est toujours plus marqué dans les cultures Norm. La technique microspectrophotométrique ne permet pas de distinguer entre polyploïdie, polyténie ou un simple doublement du contenu en ADN précédant la mitose. Mais les travaux de Levan et Biesele (1958) sur des tissus embryonnaires cultivés *in vitro* montrent que la polyploïdie et l'aneuploïdie apparaissent rapidement et qu'elles sont déterminées principalement par les conditions *in vitro*.

La question la plus importante concerne l'origine de cette polyploïdie, puisque le point essentiel de la comparaison des cultures naines et normales *in vitro* est précisément la tendance à une polyploïdie plus fréquente des cellules normales. Les cellules en intense activité mitotique dans les cultures jeunes ou dans les cultures infectées conservent en majorité leur valeur diploïde. Les déterminations d'ADN portent sur des cellules soumises à l'inhibition de contact. Dans ces conditions Levine et coll. (1965) ont trouvé que les cellules présentent une réduction de la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines.

Dès que l'activité mitotique cesse, les cellules polyploïdes apparaissent et s'accumulent au cours du temps. Une observation similaire a été faite par Mittwoch et coll. (1965) en comparant différentes souches cellulaires humaines *in vitro* ; tandis que les cellules en activité mitotique retiennent leur nombre diploïde de chromosomes, une partie des cellules deviennent polyploïdes pendant l'interphase. Il n'est pas exclu qu'une fusion de mitoses peut provoquer la polyploïdie ; mais dans ce cas le noyau résultant est souvent irrégulier de forme. Il ressort des travaux de Marciera-Coelho et coll. (1966) que l'inhibition de contact bloque certaines cellules pendant la période G₂ de la division mitotique, c'est-à-dire après la phase de réplication de l'ADN. Cela confirme les travaux montrant l'indépendance des phénomènes de la mitose et de la synthèse d'ADN (Swartz 1956 ; Naora 1957 ; Patau et Das 1961). L'ensemble des résultats rapportés ci-dessus favorisent l'hypothèse que la mitose est plus rapidement inhibée que la synthèse d'ADN. La différence entre cellules Dw et Norm *in vitro* porterait principalement sur l'induction de la synthèse d'ADN ; elle serait moins fortement inhibée dans les cellules normales. Une différenciation sous contrôle de l'hormone somatotrope agissant sur l'induction de la synthèse d'ADN a déjà été suggérée par Leuchtenberger et coll. (1954 a).

La contribution des résultats obtenus *in vitro* à la solution du problème de l'origine de la polyploïdie du foie chez les animaux tend à favoriser l'hypothèse de l'endoduplication du matériel génétique. C'est Naora (1957) qui a le plus complètement étayé cette théorie par des expériences *in vivo*. Cet auteur observe que les noyaux tétraploïdes apparaissent pendant une phase de croissance du foie sans que le nombre total de noyaux varie ; son hypothèse veut que les noyaux tétraploïdes se forment pendant l'interphase de noyaux diploïdes sans nécessiter la mitose.

Par contre, l'hypothèse de Nadal et Zajdela (1966) semble devoir être écartée. Ils constatent une diminution des cellules binucléées simultanément avec une augmentation des cellules tétraploïdes ; ils en déduisent que la cellule binucléée est un stade de transition vers la polyploïdie, par fusion des cellules au moment de la mitose. Mais leur comparaison paraît mal choisie parce que le foie des souris naines contient des cellules binucléées (observation personnelle) et pourtant aucun noyau tétraploïde ne se forme.

Pour Wilson et Leduc (1948) la formation de cellules tétraploïdes dans le foie est due à une suppression progressive de l'activité mitotique : « La première étape est un ralentissement, et finalement l'impossibilité de la division cytoplasmique dont résulte la cellule binucléée. L'étape suivante est l'impossibilité de former le fuseau, ainsi la prométaphase va jusqu'à la télophase sans division. Finalement, dans l'endomitose, les chromosomes peuvent se former et se dédoubler sans destruction de la membrane nucléaire. » Ce dernier point recouvre

l'hypothèse de Naora. Les observations *in vitro* confirment que l'hormone somatotrope initie ou provoque la duplication de l'ADN pour former des classes multiples sans que la mitose soit impliquée.

b) *Manifestation de la différenciation in vitro*

Après désagrégation du rein par trypsinisation, les cellules rénales cultivées *in vitro* perdent leur fonction d'organe et sont soumises à deux changements fondamentaux. D'une part les contacts entre cellules dans une couche monocellulaire *in vitro* ou dans un organe *in vivo* sont très différents. D'autre part, les cellules baignent dans un nouvel environnement ; elles sont soumises à des stimulus extérieurs nouveaux qui sont les mêmes pour chaque type de cellules. Dans ces conditions, on constate qu'une différenciation portant sur la polyploïdie et le volume nucléaire est exprimée par les cellules Dw et Norm. La signification réelle des résultats obtenus en culture de tissu a souvent été mise en doute. On peut reprocher le caractère apparemment indifférent adopté par les cellules en culture ; les conditions *in vitro* sont trop artificielles et n'ont aucun rapport avec des conditions physiologiques. Mais il faut connaître les limites de cette technique ; son utilisation dépend du problème à résoudre. La culture de tissu offre la possibilité unique d'isoler les cellules, de les dégager de tous les facteurs complexes qui les influencent dans l'organisme intact. Dans le cas particulier, le simple fait de comparer deux tissus dans un même environnement *in vitro* a provoqué l'apparition d'une différence impossible à remarquer dans l'animal. Plusieurs explications sont possibles.

1. L'hormone somatotrope active la croissance cellulaire *in vitro* (Moon et St Vincent 1957 ; Moon et coll. 1962). Une certaine quantité de cette hormone peut subsister dans les cellules normales et activer leur métabolisme. L'objection est que la survie de cette hormone chez le rat est au maximum de neuf heures (Tuchmann-Duplessis 1956) et probablement du même ordre de grandeur dans les cultures alors que la différenciation peut persister durant plusieurs semaines.

2. Les génomes des cellules comparées *in vitro* diffèrent dans leur structure par un gène de type mendélien. Les expériences de transplantation prouvent que le site primaire de l'action de ce gène réside dans la partie antérieure de l'hypophyse (Carsner et Rennels 1960) conduisant à une altération de la fonction de la glande. Il est peu probable que ce gène défectueux modifie le métabolisme de la cellule naine en culture ; à lui seul il ne saurait expliquer des différences de polyploïdie et de volume nucléaire.

3. La différenciation est un reflet de changements dans l'expression du génome. Cette explication paraît très raisonnable à l'auteur de cette thèse à cause des publications suivantes. Tous les tissus d'un même

organisme, ayant le même génome, n'ont pas un comportement similaire en culture de tissu ; par exemple les cellules parenchymateuses du foie ne sont pas cultivables *in vitro* (Sato et coll. 1960) ; d'autres tissus retiennent certaines particularités métaboliques en culture de tissu (Schindler et coll. 1959 ; Davidson 1964). Les effets induits par l'hormone somatotrope au niveau du génome ne peuvent pas s'exprimer *in vivo* dans le rein ; ils se traduisent par des caractéristiques morphologiques et cytochimiques *in vitro*, dans ce nouvel environnement où le fonctionnement des gènes est moins sélectif.

c) Action de l'hormone somatotrope sur les cellules

Trois voies générales d'investigation ont servi à l'approche du problème encore non résolu du mode d'action de l'hormone somatotrope sur les cellules.

1. Les études *in vivo* ont confirmé son rôle dans la stimulation de la synthèse des protéines à partir des acides aminés ; elle accélère la mobilisation des graisses et leur oxydation. Elle active encore la synthèse de l'ARN, l'ARN messager inclus (Talwar et coll. 1962 ; Korner 1963) et provoque la formation de cellules polyploïdes (Leuchtenberger et coll. 1954 a ; Swartz 1956 ; Di Stefano et Diermeier 1956).

2. Les expériences *in vitro* sur des fractions cellulaires de rats normaux et hypophysectomisés montrent que l'hormone somatotrope peut influencer la régulation de la synthèse des protéines au niveau des ribosomes. Le rendement des ribosomes de rats hypophysectomisés est inférieur à celui des rats normaux (Korner 1961, 1966 ; Staehlin 1965). La morphologie des polysomes peut être affectée par l'hypophysectomie (Yatvin 1966).

3. La troisième méthode a consisté à comparer en culture des tissus de souris normales et des tissus de souris naines privées d'hormone somatotrope à cause d'une déficience hypophysaire. Cela a permis de constater que les deux types de cellules ont un comportement différent. On sait que l'hormone somatotrope est une protéine capable d'affecter des mécanismes régulateurs du métabolisme des acides nucléiques et des protéines (Talwar et coll. 1962). Ces raisons conduisent à l'hypothèse suivante : la différenciation observée *in vitro* dépend d'une modification de l'expression du génome induite par l'hormone somatotrope et elle n'est pas causée directement par un gène particulier. Cela confirme le concept concernant le rôle de cette hormone dans la croissance (Knobil 1961) : la croissance embryonnaire est indépendante de l'hormone somatotrope et le reste pendant quelque temps après la naissance ; puis à un moment critique du développement postnatal la glande pituitaire assume les fonctions qui jusque-là étaient assurées par un système régulateur plus primitif. En l'absence d'hormone somatotrope ces fonc-

tions régressent et disparaissent, avec comme conséquence l'arrêt de la croissance (exemple des souris naines). L'induction de changements durables, irréversibles a été démontrée *in vivo* pour une autre hormone, l'œstrogène (Anderwont et coll. 1957). Une stimulation limitée avec cette hormone provoque des changements irréversibles conduisant rapidement à l'apparition de tumeurs du testicule lors d'une seconde stimulation, cette dernière étant séparée de la première par une longue période.

L'hormone somatotrope est à l'origine de multiples effets physiologiques, directs ou indirects. Il serait intéressant de pouvoir intégrer tous ces effets différents dans un système plus simple, à un niveau plus unifié. La démarche à suivre pour arriver à un tel but est suggérée par les résultats de cette thèse : tous les effets variés dépendent d'enzymes eux-mêmes soumis, soit dans leur synthèse, soit dans leur action, à des systèmes régulateurs de la croissance modifiés par la présence ou l'absence d'hormone somatotrope. La biologie actuelle ne dispose peut-être pas encore des techniques pour l'observation de changements au niveau des chromosomes des vertébrés supérieurs, mais une voie d'approche est ouverte. Il est intéressant de signaler ici l'action d'une hormone de croissance et de différenciation des insectes, l'ecdysone, qui agit directement sur le noyau par régulation de l'expression du matériel génétique (Clever 1964).

C. Réponse cellulaire à l'infection par le virus PR8 et établissement des subcultures

a) *Cultures infectées par le PR8*

La prolifération cellulaire intense succédant aux effets pathogènes du virus est caractérisée par une croissance accélérée, entrecroisée avec perte complète de l'inhibition de contact ; elle concerne des cellules de type fibroblastique. Cet effet est en accord avec les travaux déjà publiés sur ce sujet (Niven et coll. 1962 ; Leuchtenberger et coll. 1965) et a été décrit pour d'autres virus, tels le polyome et le SV40 (Vogt et Dulbecco 1960 ; Shein et coll. 1964). Ce qui est observé dans les cultures après infection par le PR8 illustre remarquablement bien les thèses élaborées par Leuchtenberger et Leuchtenberger (1963 a, 1964) concernant la relation virus - cellule hôte. L'analyse cytologique et cytochimique simultanée des altérations morphologiques et des changements du métabolisme des acides nucléiques après infection *in vitro* ou *in vivo* par une variété de virus (virus ADN et ARN) leur a permis de mettre en évidence un phénomène commun. Il s'agit de deux effets du virus strictement opposés. L'effet I concerne la relation virus - cellule hôte en faveur de la duplication du virus ; l'activité du virus est visible

dans la cellule, mais celle-ci est vouée à la mort. L'effet II concerne la relation virus - cellule hôte en faveur de la multiplication cellulaire ; il n'y a pas d'activité visible du virus, mais la mitose cellulaire est stimulée, conduisant dans certains cas à la formation de tumeurs. Dans les cultures rénales Dw et Norm l'effet I touche principalement les cellules de type épithélial. L'effet II s'observe sur les cellules de type fibroblastique. On peut supposer que la susceptibilité différente de ces deux types de cellules dépend de la constitution de la membrane cellulaire qui doit comporter des récepteurs spécifiques pour l'attachement et la pénétration du virus.

L'augmentation anormale d'ADN se remarque dans des noyaux de type épithélioïde qui ne se divisent pas activement ; leur teneur en ADN est 20 à 30 fois plus élevée que celle d'un noyau diploïde. L'origine de cette augmentation doit dépendre, comme dans les cultures témoins, de plusieurs endoduplications successives du matériel génétique, plutôt que par fusion de noyaux ou par mitoses anormales. La mitose semble y être inhibée, mais pas la synthèse d'ADN. Ces noyaux géants voisinent avec les noyaux monstrueux reconnus pour la première fois par Leuchtenberger et coll. (1965) dans des cultures infectées par le PR8. De semblables noyaux ont été décrits dans des cultures infectées par le SV40 (Enders et coll. 1964). Leur forme irrégulière doit dépendre d'un déséquilibre chromosomique très prononcé. Une autre cause de ces monstruosité peut être recherchée dans une altération de la membrane nucléaire pendant l'infection, ce qui est observé dans certaines cellules binucléées. La polycaryocytose n'a pas été observée après infection par le PR8 bien que certains virus du groupe des Myxovirus et d'autres l'induisent (Shein et coll. 1964 ; Roizman 1962 ; Kohn 1965).

La présence du virus dans la cellule perturbe complètement les mécanismes de régulation, tant dans les cultures Dw que Norm. Les différences sont abolies : même titre hémagglutinant du surnageant, séquence identique des événements cytologiques et cytochimiques sont autant d'éléments qui soulignent qu'une fois que le virus agit dans la cellule, il est capable de masquer le métabolisme normal et de le détourner à son propre profit. A priori cette observation n'est pas inattendue parce que dans le conflit qui oppose la duplication du virus au métabolisme normal de la cellule, l'activité virale domine toutes les autres fonctions de manière générale. La mort de la cellule hôte semble bien être un effet direct de l'activité virale, tandis que l'induction de la mitose succédant à la phase aiguë de l'infection est plus difficile à comprendre. Leuchtenberger (1964) suggère que la prolifération anormale succédant à l'infection est un effet indirect : les substances virales et cellulaires relâchées par les cellules détruites modifient l'écologie de la cellule non infectée initiant la mitose. Ce processus serait partiellement analogue à une régénération ou une réparation cellulaire.

b) *Subcultures*

L'aneuploïdie apparaît très rapidement en culture de tissus embryonnaires de souris (Levan et Bieseke 1958) et les subcultures qui en dérivent sont toujours hypotétraploïdes et jamais diploïdes (Hsu 1961 ; Todaro et Green 1963). Les résultats obtenus avec des cellules d'origine plus âgées (nouveaux-nés de deux à trois semaines) confirment ces observations. Il est cependant remarquable qu'une des subcultures dérivant de cellules infectées (THO₁₆Norm PR8) ait retrouvé un génome diploïde, très probablement hétéroploïde bien que la preuve n'en soit pas donnée. Des subcultures diploïdes de tissus d'origine humaine ont pu être obtenues dans des conditions très strictes, mais leur limite de vie n'est pas indéfinie (Hayflick et Moorhead 1961).

Deux conditions sont nécessaires pour la transformation morphologique des cultures de tissu rénal de souris : l'aneuploïdisation et l'induction de la mitose. L'aneuploïdisation apparaît à la suite de non-disjonctions ou d'une perte de chromosomes dans le cytoplasme au cours de la mitose. Les changements structuraux comprenant des chromosomes anormalement petits et la formation de métacentriques à partir de chromosomes télacentriques sont régulièrement trouvés, conformément à d'autres observations (Rothfels et coll. 1959 ; Hsu 1961). Certaines évidences données par Ohno et coll. (1960) et par Nelson-Rees et coll. (1964) permettent l'interprétation suivante : un chromosome métacentrique se forme suivant un processus de type robertsonien, c'est-à-dire par fusion centromérique de deux chromosomes télacentriques. Les fragments de chromosomes pourraient appartenir à la région centromérique d'un chromosome. Apparemment, la transformation morphologique *in vitro* est un processus de réajustement génétique de cellules soumises à un nouvel environnement. Le génome le plus compétitif est sélectionné.

Le virus PR8 peut accélérer ce processus d'adaptation qui est la conséquence d'un réarrangement du génome opéré au moment de la mitose. Le virus agit de deux manières sur la mitose : d'une manière directe au moment de l'infection, en provoquant de nombreuses mitoses anormales ; d'une manière indirecte en stimulant la multiplication cellulaire, et par là en augmentant les possibilités de remaniements du génome. L'incidence d'anomalies chromosomiques est plus élevée dans les subcultures infectées à l'origine par le PR8. On sait qu'après infection par différents virus, certains enzymes, en particulier une désoxyribonucléase, sont libérés par les lysosomes et sont capables de causer des dommages aux chromosomes (Allison et Mallucci 1965 ; Allison et Paton 1965). Certains virus provoquent des aberrations spécifiques sur les chromosomes (Stich et coll. 1965 ; Yerganian et coll. 1962). Les anomalies chromosomiques rencontrées dans les subcultures infectées par le PR8 ne suggèrent pas une action spécifique du virus, mais le virus semble plutôt contribuer à l'exagération de certains remaniements struc-

turaux apparaissant spontanément dans les subcultures témoins. Ce concept de l'exagération de processus pathologiques sous l'influence du PR8 est supporté par d'autres travaux. Imagawa et coll. (1957) rapportent que des souris infectées avec le virus influenza et traitées avec l'uréthane développent plus de tumeurs du poumon que celles traitées à l'uréthane seul. Dans les bronches, le PR8 augmente la fréquence et la sévérité de la prolifération atypique provoquée par l'inhalation de la fumée de cigarette (Leuchtenberger et coll. 1963 b). Le virus influenza est un facteur additionnel impliqué dans la prolifération atypique pouvant conduire à des cancers pulmonaires après inhalation combinée de virus et d'un aérosol d'hydrocarbures (Kotin et Wiseley 1963).

En ce qui concerne la transformation morphologique proprement dite, l'origine des cellules importe plus que l'action du virus PR8 : les cultures Dw infectées ou non se transforment plus rarement que les cultures Norm. Cette différence est quantitative et non qualitative. Dans ce phénomène le rôle de l'hormone somatotrope peut être comparé au facteur de promotion dans la théorie de Berenblum (1959). Cet auteur met en évidence deux étapes nécessaires à la carcinogénèse. La première comprend un processus irréversible d'initiation, la seconde un processus de promotion qui détermine l'évolution visible de la transformation opérée par le processus d'initiation. Le second processus est un facteur quantitatif. Après disparition de l'activité visible du virus dans les cellules, certains mécanismes de régulation sont retrouvés. Une observation similaire a été rapportée par Medina et Sachs (1965) : la morphologie d'une cellule transformée par le polyome dépend étroitement du type cellulaire normal avant l'infection.

Les subcultures Dw et Norm, témoins et infectées donnent des résultats pour lesquels la fréquence des irrégularités nucléaires varie plus ou moins proportionnellement au nombre de chromosomes. Le mécanisme du bourgeonnement nucléaire et de la formation de micronoyaux n'est pas encore compris, mais il pourrait résulter d'une élimination sélective de chromosomes pendant l'interphase (Crosby-Longwell et Yerganian 1965). L'analyse de ces irrégularités morphologiques du noyau présente un intérêt parce que leur fréquence peut varier après une infection virale. Après transformation par le virus du sarcome de Rous, des cultures ne présentent pas d'augmentation du nombre de micronoyaux et de bourgeonnements nucléaires, tandis que les mêmes cultures après transformation par le SV40 montrent une fréquence élevée de ces mêmes irrégularités morphologiques (Elston et Stenkvist 1965).

Une connaissance plus approfondie de la transformation morphologique, c'est-à-dire de l'acquisition de propriétés conduisant à une multiplication indéfinie permettrait une meilleure compréhension de la croissance, normale ou tumorale. Le parallélisme entre la transformation morphologique *in vitro* et l'acquisition de propriétés néoplasiques n'est

pas vérifié avec ce genre de culture. La transformation morphologique est rare dans les cultures rénales de souris naines et il se peut qu'elle soit un premier stade vers la transformation néoplasique. Par analogie, il est intéressant de rappeler ici quelques-uns des nombreux travaux prouvant le rôle déterminant de l'hormone somatotrope pour la croissance de certains types de cancer (Griffin 1953 ; Sterental et coll. 1963 ; Weisburger 1964) tandis que la transformation néoplasique est très rare chez les souris naines (Heston 1966).

BIBLIOGRAPHIE

- ALFERT, M., H. A. BERN et R. H. KAHN. 1955. — Hormonal influence on nuclear synthesis IV. Karyometric and microspectrophotometric studies of rat thyroid nuclei in different functional states. *Acta anat.* 23, 185-205.
- ALLISON, A. C. et L. MALLUCCI. 1965. — Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virus-infected cell cultures. *J. Exp. Med.* 121, 463-476.
- et G. R. PATON. 1965. Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. *Nature* 207, 1170-1173.
- ALVAREZ, M. R. et R. R. COWDEN. 1966. — Cytophotometric study of acid dye binding by proteins of isolated frog liver nuclei in relation to nuclear size. *Histochemie* 7, 22-27.
- ANDERWONT, H. B., M. B. SHIMKIN et H. Y. CANTER. 1957. — Effect of discontinued estrogenic stimulation upon the development and growth of testicular tumors in mice. *J. Nat. Cancer Inst.* 18, 1-39.
- BACHMANN, K. et R. R. COWDEN. 1965. — Quantitative cytophotometric studies on polyploid liver cell nuclei of frog and rat. *Chromosoma* 17, 181-193.
- BARTKE, A. 1965. — The response of two types of dwarf mice to growth hormone, thyrotropin, and thyroxine. *Gen. Comp. Endocrin.* 5, 418-426.
- BERENBLUM, I. — Some new implications of the two-stage mechanism in the study of skin carcinogenesis. Dans *Carcinogenesis*, Ciba Foundation Symp. 1959.
- BUCHER, O. 1954. — Caryometric studies of tissue cultures. *Intern. Rev. Cytol.* 3, 69-111.
- CARSNER, R. L. et E. G. RENNELS. 1960. — Primary site of gene action in anterior pituitary dwarf mice. *Science* 131, 829.
- CLEVER, U. — Puffing in giant chromosomes of Diptera and the mechanism of its control. Dans : Bonner et T'so *The Nucleohistones* (Holden-Day 1964).
- CROSBY-LONGWELL, A. et G. YERGANIAN. 1965. — Some observations on nuclear budding and nuclear extrusions in a Chinese Hamster cell culture. *J. Nat. Cancer Inst.* 34, 53-69.
- DAVIDSON, E. H. — Differentiation in monolayer tissue culture cells. Dans Caspari, *Advances in Genetics*, vol. 12 (Acad. Press 1964).
- DEITCH, A. D. 1955. — Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye, naphtol yellow S, by tissue sections and by purified proteins. *Lab. Invest.* 4, 324-351.

- DI STEFANO, H. S. et H. F. DIERMEIER. 1956. — Effects of hypophysectomy and growth hormone on ploidy distribution and mitotic activity of rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 590-594.
- EAGLE, H. 1959. — Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432-437.
- ELSTON, R. N. et B. STENKVIST. 1965. — Quantitative estimation of nuclear buds and micronuclei in bovine cells transformed by Rous sarcoma and SV40 viruses. *Z. Zellforsch.* 68, 543-549.
- FEULGEN, R. et H. ROSSENBECK. 1924. — Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. Physiol. Chem.* 135, 203-248.
- GRIFFIN, A. C., A. P. RINFRET et V. F. CARSIGLIA. 1953. — The inhibition of liver carcinogenesis with 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene in hypophysectomized rats. *Cancer Res.* 13, 77-79.
- HAYFLICK, L. et P. S. MOORHEAD. 1961. — The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exptl. Cell Res.* 25, 585-621.
- HELWEG-LARSEN, H. F. 1952. — Nuclear class series. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* 92. Ejnar Munksgaard, Copenhagen.
- HESTON, W. E. The genetic aspects of lung tumors in mice. Dans : Severi, *Lung tumours in animals*. Division of Cancer Research. Perugia 1966.
- HSU, T. C. 1961. — Chromosomal evolution in cell populations. *Intern. Rev. Cytol.* 10, 69-161.
- IMAGAWA, D. T., M. YORHIMORI et J. M. ADAMS. 1957. — The death rate in mice with pulmonary tumors induced with urethan and influenza virus. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 2, 217.
- JACOBJ, W. 1925. — Über das rythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. *Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organ.* 106, 124.
- JOHN, P. — *Cell and tissue culture* (3rd ed. Livingston 1965).
- KASTEN, F. 1956. — Cytophotometric studies of DNA in several strains of mice. *Physiol. Zool.* 29, 1.
- KASTEN, F. H. 1960. — The chemistry of Schiff's reagent. *Intern. Rev. Cytol.* 10, 1-100.
- KNOBIL, E. — The pituitary growth hormone : some physiological considerations. Dans : Zarrow, *Growth in Living Systems* (Basic Books 1961).
- KOHN, A. 1965. — Polykaryocytosis induced by Newcastle disease virus in monolayers of animal cells. *Virology* 26, 228-245.
- KORNER, A. 1961. — The effect of hypophysectomy and growth hormone treatment of the rat on the incorporation of amino-acid into isolated liver ribosomes. *Biochem. J.* 81, 292-297.
- 1963. — Growth hormone control of messenger RNA synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 13, 386-389.

- et J. M. GUMBLEY. 1966. — Impaired ability of ribosomes to react with polyuridylic acid after hypophysectomy of the rat: removal of the disability by a cell sap factor. *Nature* 209, 505-506.
- KOTIN, P. et D. V. WISELEY. 1963. — Production of lung cancer in mice by inhalation exposure to influenza virus and aerosols of hydrocarbons. *Prog. exp. Tumor Res.* 3, 186-215.
- LEUCHTENBERGER, C. 1950. — Cytochemical study of pycnotic nuclear degeneration. *Chromosoma* 3, 449-473.
- et F. SCHRADER. 1951. — Relationship between nuclear volumes, amount of intranuclear proteins and DNA in various rat cells. *Biol. Bull.* 101, 95-98.
- H. F. HELWEG-LARSEN et L. MURMANIS. 1954 a. — Relationship between hereditary pituitary dwarfism and the formation of multiple DNA classes in mice. *Lab. Investig.* 3, 245-260.
- R. LEUCHTENBERGER et A. M. DAVIES. 1954 b. — A microspectrophotometric study of the DNA content in cells of normal and malignant human tissues. *Amer. J. Pathol.* 30, 65-85.
- I. MURMANIS, L. MURMANIS, S. ITO et D. WEIR. 1956. — Interferometric dry mass and microphotometric arginine determinations on bull sperm nuclei with normal and abnormal DNA content. *Chromosoma* 8, 73-86.
- 1958. — Quantitative determination of DNA in cells by Feulgen microspectrophotometry. Dans : Danielli, *General cytochemical Methods*, vol. I. (Acad. Press).
- G. S. BOYER et J. J. STRAIN. 1959. — Quantitative cytochemical investigations on the effect of virus on cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 81, 73-83.
- et R. LEUCHTENBERGER. 1963 a. — Cytological and cytochemical effects of agents implicated in various pathological conditions : The effects of viruses and of cigarette smoke on the cell and its nucleic acids. *Intern. Rev. Cytol.* 14, 281-326.
- R. LEUCHTENBERGER, F. RUCH, K. TANAKA et T. T. TANAKA. 1963 b. — Cytological and cytochemical alterations in the respiratory tract of mice after exposure to cigarette smoke, influenza virus, and both. *Cancer Res.* 23, 555-565.
- 1964. — The significance of the intracellular nucleic acid metabolism and the host cell-virus relationship for virus infections. *Bibl. Microbiol. Fasc.* 4, 18-42.
- R. LEUCHTENBERGER, T. BRUNNER, D. NORLIN et S. WEISS. 1965. — Transformation induced by PR8 influenza virus in primary cultures of mouse kidney and bronchus, and production of malignant kidney tumors in mice by subcultures. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53, 694-701.
- et R. LEUCHTENBERGER. 1966. — The role of influenza virus in the development of malignant transformation in vitro and in the respiratory tract of mice, with and without exposure to cigarette smoke. Dans Severi, *Lung Tumours in Animals*. Division of Cancer Research. Perugia.

- LEVAN, A. et J. J. BIESELE. 1958. — Role of chromosomes in cancerogenesis, as studied in serial tissue culture of mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 71, 1022-1053.
- LEVINE, E. M., Y. BECKER, C. W. BOONE et H. EAGLE. 1965. — Contact inhibition, macromolecular synthesis and polyribosomes in human diploid fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53, 350-356.
- LISON, L. — *Histochimie et cytochimie animales* (Paris, Gauthier-Villars 1953).
- MACIERA-COELHO, A., J. PONTÉN et L. PHILIPSON. 1966. — Inhibition of the division cycle in confluent cultures of human fibroblasts in vivo. *Exptl. Cell Res.* 43, 20-29.
- MEDINA, D. et L. SACHS. 1965. — A cause of variation in clonal morphology of Polyoma transformed Hamster cells. *Virology* 27, 398-408.
- MITTWOCH, U., K. P. LELE et W. S. WEBSTER. 1965. — DNA synthesis in cultured human cells and its bearing on the concept of endoreplication and polyploidy. *Nature* 208, 242-244.
- MOON, H. D., L. ST VINCENT. 1957. — Effect of somatotropin on cells in tissue culture. *Science* 125, 643-644.
- V. L. JENTOFT et C. H. LI. 1962. — Effect of human growth hormone on growth of cells in tissue culture. *Endocrinology* 70, 31-38.
- NADAL, C. et F. ZAJDELA. 1966. — Polyplôidie somatique dans le foie de rat. I. Le rôle des cellules binucléées dans la genèse des cellules polyploïdes. *Exptl. Cell Res.* 42, 99-116.
- NAORA, H. 1957. — Microspectrophotometry of cell nuclei stained with the Feulgen reaction. IV. Formation of tetraploid nuclei in rat liver cells during postnatal growth. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 3, 949-975.
- NELSON-REES, W. A., A. J. KNIAZEFF et N. B. DARBY. 1964. — Preservation of bulk chromatin with decrease in number of chromosomes in cells of an established bovine kidney line. *J. Nat. Cancer Inst.* 33, 347-361.
- NIVEN, J. S. F., J. A. ARMSTRONG, B. M. BALFOUR, H. G. KLEMPERER et D. A. J. TYRRELL. 1962. — Cellular changes accompanying the growth of influenza virus in bovine cell cultures. *J. Pathol. Bacteriol.* 84, 1-18.
- OHNO, S., E. T. KOVACS et R. KINOSITA. 1960. — A Robertsonian type of chromosomal change in L4946 mouse acites lymphoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 24, 1187-1197.
- PATAU, K. et N. K. DAS. 1961. — The relation of DNA synthesis and mitosis in Tobacco pith tissue cultured in vitro. *Chromosoma* 11, 553-572.
- PERSKE, W. S., R. E. PARKS et D. L. WALKER. 1957. — Metabolic differences between hepatic parenchymal cells and a cultured cell line from liver. *Science* 125, 1290-1291.
- POLLISTER, A. W. et H. RIS. 1947. — Nucleoprotein determination in cytological preparations. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 12, 147-157.
- ROIZMAN, B. 1962. — Polykaryocytosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27, 327-340.

- ROTHFELS, K. H. et R. C. PARKER. 1959. — The karyotype of cell lines recently established from normal mouse tissues. *J. Exp. Zool.* 142, 507-519.
- SALK, J. E. 1948. — A plastic plate for use in tests involving virus hemagglutination and other similar reactions. *Science* 108, 749.
- SATO, G., L. ZAROFF et S. E. MILLS. 1960. Tissue culture populations and their relation to the tissue of origin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46, 963-972.
- SCHINDLER, R., M. DAY et G. A. FISCHER. 1959. — Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine in vitro. *Cancer Res.* 19, 47-51.
- SCHRADER, F. et C. LEUCHTENBERGER. 1950. — A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus*. *Exp. Cell Res.* 1, 421-452.
- SHEIN, H. M. et J. F. ENDERS. 1962. — Transformation induced by SV40 in human renal cell cultures. Morphology and growth characteristics. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 48, 1164-1172.
- J. F. ENDERS, L. PALMER et E. GROGAN. 1964. — Further studies on SV40-induced transformation in human renal cell cultures. I. Eventual failure of subcultivation despite a continuing high rate of cell division. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 115, 618-621.
- SINGER, M. 1952. — Factors which control the staining of tissue sections with acid and basic dyes. *Intern. Rev. Cytol.* 1, 211-255.
- SMITH, J. D., G. FREEMAN, M. VOGT et R. DULBECCO. 1960. — The nucleic acid of polyoma virus. *Virology* 12, 185-186.
- SNELL, G. D. 1929. — Dwarf, a new mendelian recessive character of the house mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 15, 733-734.
- SOMERS, C. E., A. COLE et T. C. HSU. 1963. — Isolation of chromosomes. *Exptl. Cell Res., suppl.* 9, 220-234.
- STAEHLIN, M. 1965. — Effect of hypophysectomy on rat liver polyribosomes. *Biochem. Z.* 342, 459-468.
- STERENTAL, A., J. M. DOMINGUEZ, C. WEISSMANN et O. H. PEARSON. 1963. Pituitary role in the estrogen dependency of experimental mammary cancer. *Cancer Res.* 23, 481-484.
- STICH, H. F. et D. S. YOHAN. 1965. — Viruses and mammalian chromosomes. V. Chromosomes aberrations in tumors of Syrian Hamsters induced by adenovirus type 12. *J. Nat. Cancer Inst.* 35, 603-615.
- SWARTZ, F. J. 1956. — The development in the human liver of multiple desoxyribose nucleic acid (DNA) classes and their relationship to the age of the individual. *Chromosoma* 8, 53-72.
- SWIFT, H. H. 1950. — The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *Physiol. Zool.* 23, 169-198.
- et E. RASH. 1956. — Microspectrophotometry with visible light. Dans : Oster et Pollister, *Physical Techniques in Biological Research*, vol. 3 (Acad. Press).

- TALWAR, G. P., N. C. PANDA, G. S. SARIN et A. J. TOLANI. 1962. — Effect of growth hormone on RNA metabolism. I. Incorporation of radioactive phosphate into RNA fractions of rat liver. II. Effect of growth hormone administration on the activities of 5'-nucleotidase, adenase, guanase and xanthine oxidase. *Biochem. J.* 82, 173-179.
- TODARO, G. J. et H. GREEN. 1963. — Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17, 299-313.
- TUCHMANN-DUPLESSIS, H. 1956. — Hormones hypophysaires somatotrope et corticotrope. *Croissance et métabolisme* (Masson).
- VOGT, M. et R. DULBECCO. 1960. — Virus-cell interaction with a tumor producing virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46, 365-370.
- WALKER, B. E. 1958. — Polyploidy and differentiation in the transitional epithelium of mouse urinary bladder. *Chromosoma* 9, 105-118.
- WEISBURGER, J. H., S. R. PAI et R. S. YAMAMOTO. 1964. — Pituitary hormones and liver carcinogenesis with N-hydroxy-N-2-Fluorenylacetamide. *J. Nat. Cancer Inst.* 32, 881-895.
- WILSON J. M. et E. H. LEDUC. 1948. — The occurrence and formation of binucleate and multinucleate cells and polyploid nuclei in the mouse liver. *Amer. J. Anat.* 82, 353-391.
- YATVIN, M. B. 1966. — Polysome morphology : evidence for endocrine control during chick embryogenesis. *Science* 151, 1001-1003.
- YERGANIAN, G., H. M. SHEIN et J. F. ENDERS. 1962. — Chromosomal disturbances observed in human fetal renal cells transformed in vitro by SV40 and carried in culture. *Cytogenetics* 1, 314-324.
- ZAROFF, L., G. SATO et S. E. MILLS. 1961. — Single-cell platings from freshly isolated mammalian tissue. *Exptl. Cell Res.* 23, 565-575.

RÉSUMÉ

Dans cette thèse, les reins de souris normales et de souris naines caractérisées par une déficience hypophysaire (souche Snell) sont comparés *in vivo* et *in vitro* (culture de tissu). Les résultats essentiels des études cytologiques et cytochimiques corrélatives sont brièvement résumés comme suit.

1. *In vivo* la seule différence observable est l'hypoplasie du rein chez la souris naine sans que les dimensions cellulaires soient affectées.
2. *In vitro* les cellules témoins des reins de souris naines ont des dimensions plus réduites et présentent moins de polyploïdie (microspectrophotométrie sur Feulgen) que les cellules des reins de souris normales.
3. La réponse globale des cellules rénales de souris naines et normales à l'infection par le virus influenza PR8 *in vitro* est essentiellement la même. Mais la transformation morphologique des cultures de tissu rénal de souris naines est beaucoup moins fréquente que celle des cultures de tissu rénal de souris normales, et cela même en dépit de l'infection par le virus PR8.

Achévé d'imprimer
le quinze juillet mil neuf cent soixante-sept
sur les presses
de l'Imprimerie Vaudoise à Lausanne

